

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Axel Rethwilm

Exzitotoxische Prozesse in der SIV -Enzephalitis

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Michaela Schmidt
aus Würzburg

Würzburg, Juli 2010

Referentin: Frau Prof. Dr. med. vet. Eleni Koutsilieri

Korreferent: Herr Prof. Dr. med. Axel Rethwilm

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 2010

Die Promovendin ist Ärztin.

Exzitotoxische Prozesse in der SIV-Enzephalitis

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1. Einleitung.....	1
1.1 HIV	2
1.1.1 Struktur und genetische Ausstattung des HIV	2
1.1.2 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion	3
1.2 HIV-Demenz	5
1.2.1 Klinischer Verlauf der HIV-Demenz.....	6
1.2.2 Histopathologie der HIV-Demenz.....	7
1.2.3 Neuropathogenese der HIV-Demenz.....	7
1.2.4 Pharmakologische Behandlung der HIV-Demenz.....	9
1.3 Das SIV/Rhesusaffen-Modell.....	11
1.4 Basalganglien	15
1.4.1 Funktionelle Anatomie des Putamen und Nucleus Accumbens als Teile des Striatums	15
1.4.2 Neurotransmittersysteme	19
1.4.2.1 Das glutamaterge System	19
1.4.2.1.1 Die glutamaterge Synapse	19
1.4.2.1.2 Glutamatrezeptoren	21
1.4.2.1.3 Die glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2.....	23
1.4.2.1.4 Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität	24
1.4.2.2 Das dopaminerge System	28
1.4.2.3 Wechselwirkungen zwischen Glutamat, Dopamin und GABA.....	29
1.4.2.4 TNF- α als weiteres Neurotoxin	30
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	31
2. Material und Methoden.....	34
2.1 Material	34
2.1.1 Chemikalien.....	34
2.1.2 Geräte und Sonstiges	36
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Versuchstiere	38
2.2.1.1 Haltung	38
2.2.1.2 Pharmakologische Darstellung	38
2.2.1.3 Infektion	39
2.2.1.4 Tötung	39
2.2.1.5 Sektion.....	40
2.2.1.6 Tabelle der verwendeten Versuchstiere	40
2.2.2 Archivierung.....	42
2.2.3 Probengewinnung und Bestimmung ihres Gesamtproteingehalts.....	42
2.2.3.1 Subzelluläre Fraktionierung nach Jarabek.....	42
2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford	43
2.2.4 Bestimmung von EAAT1 und EAAT2.....	44
2.2.4.1 Prinzip des spezifischen Proteinnachweises mittels Western Blot-Verfahren.....	44
2.2.4.1.1 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.2.4.1.2 Western Blot.....	45
2.2.4.1.3 Immunfärbung der Nitrozellulosemembran.....	46

2.2.4.2	Protokoll des Vorgehens beim Western Blot.....	47
2.2.4.2.1	SDS-Gelelektrophorese	47
2.2.4.2.2	Elektroblot.....	49
2.2.4.2.2.1	Semi-dry Verfahren.....	49
2.2.4.2.2.2	Wet-(Tank)-Blot Verfahren.....	50
2.2.4.2.3	Ponceau-S-Färbung	51
2.2.4.2.4	Immunfärbung und deren Visualisierung	51
2.2.4.2.5	Verwendete Lösungen	53
2.2.4.2.6	Auswertung des Western Blots.....	54
2.2.4.3	Troubleshooting.....	54
2.2.4.3.1	Antikörper.....	54
2.2.4.3.2	Standard.....	55
2.2.4.3.3	Gruppierung/Auftragen der Proben	55
2.2.4.3.4	Blottingverfahren.....	56
2.2.4.3.5	Inkubations- und Blockingzeiten.....	56
2.2.4.3.6	Anzahl der verwendeten Gele.....	56
2.2.4.3.7	Belichtungsmethode	56
2.2.5	Bestimmung des TNF- α	57
2.2.5.1	Bestimmung des TNF- α im Putamen	57
2.2.5.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	57
2.2.5.1.1.1	Standard PCR	58
2.2.5.1.1.2	Quantitative Real-Time PCR (qPCR).....	59
2.2.5.2	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	61
2.2.5.3	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	62
2.2.5.4	Bestimmung des TNF- α im Nucleus Accumbens.....	64
2.2.5.4.1	Prinzip des ELISA	64
2.2.5.4.2	Protokoll des Vorgehens beim ELISA.....	65
2.2.6	Statistik und graphische Darstellung der Ergebnisse.....	66

3. Ergebnisse.....68

3.1 Probenpräparation..... 68

3.1.1	Proteingehalt im Putamen.....	68
3.1.2	Proteingehalt im Nucleus Accumbens.....	69

3.2 Proteinexpression der Ladekontrolle GAPDH im Putamen und Nucleus Accumbens.....70

3.3 Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen..... 72

3.3.1	Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn unbehandelter, SIV-infizierter Rhesusaffen	72
3.3.1.1	Gesamte relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn unbehandelter, SIV-infizierter chinesischer und indischer Rhesusaffen.....	73
3.3.1.1.1	Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen unbehandelter, SIV-infizierter chinesischer und indischer Rhesusaffen.....	73
3.3.1.1.2	Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens unbehandelter, SIV-infizierter chinesischer und indischer Rhesusaffen.....	75
3.3.1.2	Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn chinesischer SIV-infizierter Rhesusaffen	76
3.3.1.2.1	Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen chinesischer SIV-infizierter Rhesusaffen	77
3.3.1.2.2	Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens chinesischer SIV-infizierter Rhesusaffen	78
3.3.1.3	Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn indischer SIV-infizierter Rhesusaffen	80
3.3.1.3.1	Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen indischer SIV-infizierter Rhesusaffen	80
3.3.1.3.2	Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens indischer SIV-infizierter Rhesusaffen.....	82
3.3.1.4	Vergleich der relativen Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn von Rhesusaffen aus China und Indien.....	83

3.3.1.4.1	Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen chinesischer und indischer Rhesusaffen	84
3.3.1.4.2	Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens chinesischer und indischer Rhesusaffen.....	85
3.3.2	Effekte verschiedener Pharmaka auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen.....	87
3.3.2.1	Effekte von Memantin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen	87
3.3.2.1.1	Effekte von Memantin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen	87
3.3.2.1.2	Effekte von Memantin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens SIV-infizierter Rhesusaffen.....	90
3.3.2.2	Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen	92
3.3.2.2.1	Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen	92
3.3.2.2.2	Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens SIV-infizierter Rhesusaffen.....	94
3.4	Protein- und Genexpression des TNF-α im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen.....	97
3.4.1	Protein- und Genexpression des TNF- α im Gehirn unbehandelter, SIV-infizierter Rhesusaffen.	97
3.4.1.1	Relative Genexpression des TNF- α im Putamen unbehandelter, SIV-infizierter Rhesusaffen .	97
3.4.1.2	Proteinexpression des TNF- α im Nucleus Accumbens unbehandelter, SIV-infizierter Rhesusaffen	99
3.4.2	Effekte verschiedener Pharmaka auf die Protein- und Genexpression des TNF- α im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen.....	100
3.4.2.1	Effekte von Memantin und Selegilin auf die Protein- und Genexpression des TNF- α im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen	100
3.4.2.1.1	Effekte von Memantin und Selegilin auf die relative Genexpression des TNF- α im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen	100
3.4.2.1.2	Effekte von Memantin und Selegilin auf die Proteinexpression des TNF- α im Nucleus Accumbens SIV-infizierter Rhesusaffen	101
3.4.2.2	Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die Protein- und Genexpression des TNF- α im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen	102
3.4.2.2.1	Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die relative Genexpression des TNF- α im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen	103
3.4.2.2.2	Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die Proteinexpression des TNF- α im Nucleus Accumbens SIV-infizierter Rhesusaffen	104
4.	Diskussion.....	105
4.1	EAAT1 und EAAT2	105
4.1.1	EAAT1 und EAAT2 im Verlauf der SIV-Infektion	105
4.1.2	Pharmakologische Beeinflussbarkeit von EAAT1 und EAAT2.....	107
4.2	TNF-α	111
4.2.1	TNF- α im Verlauf der SIV-Infektion	111
4.2.2	Pharmakologische Beeinflussbarkeit des TNF- α	113
4.3	Unterschiede zwischen Putamen und Nucleus Accumbens hinsichtlich der Expression von EAAT1, EAAT2 und TNF-α sowie ihrer pharmakologischen Beeinflussbarkeit	116
4.4	Unterschiede in der Expression von EAAT1, EAAT2 und TNF-α sowie im Krankheitsverlauf chinesischer und indischer Rhesusaffen	118
5.	Zusammenfassung.....	121
6.	Literaturverzeichnis.....	124

Danksagung

Lebenslauf

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIDS	engl.: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionsäure
aq.	aqua
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	engl.: <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bidest.	bidestilliert (zweifach destilliert)
bzgl.	Bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
cDNA	complementary DNA (durch reverse Transkriptase aus mRNA synthetisiert)
COMT	Katecholamin-O-Methyltransferase
CREB	engl.: <i>cyclic cAMP response element</i>
CT	engl.: <i>cycle threshold</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds-DNA	doppelsträngige DNA
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DTT	Dithiothreitol
EAAT	engl.: <i>excitatory amino acid transporter</i> (Exzitatorische Aminosäuretransporter)
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	und andere
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm

g	Erdschwerebeschleunigung [9,81 m/s ²]
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	engl.: <i>glial cell line- derived neurotrophic factor</i>
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HAART	hoch aktive antiretrovirale Therapie
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HIVE	HIV-Enzephalitis
HRP	engl.: <i>Horse-radish Peroxidase</i> (aus Meerrettich gewonnene Peroxidase)
HVA	Homovanillinsäure
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
KA	Kainat
k.A.	keine Angabe(n)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
konz.	konzentriert
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	Mol
M.	lat.: <i>Morbus</i> (Erkrankung)
mA	Milliampere
MAO-B	Monoaminoxidase-B
MCMD	engl.: <i>minor cognitive motor disorder</i>
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
mind.	mindestens
ml	Milliliter

mM	Millimol
mRNA	messenger-RNA
Na ⁺	Natrium-Kation
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid/Kochsalz
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natronlauge
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoruntereinheit
OD	optische Dichte
p.o.	per os (oral)
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
rel.	relativ (-e, -r, -s)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Drehungen pro Minute)
RPMI	engl.: <i>Rosswell Park Memorial Institute Medium</i>
R ²	Determinationskoeffizient/Bestimmtheitsmaß
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
Sek.	Sekunde(n)
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
S.E.M.	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SIV	Simianes Immundefizienz Virus
sog.	sogenannt (e,r,s)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
Temp.	Temperatur

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polysorbat 20 (=polysorbate surfactant)
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume
VE	voll entsalzt
VGLUT	vesikulärer glutamaterger Transporter
vs.	versus
w/v	weight per volume
ZNS	Zentrales Nerven System
z.B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
3-MT	3-Methoxytyramin

1. Einleitung

Weltweit lebten im Jahr 2008 ca. 33,4 Millionen Menschen mit einer Infektion durch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), die Zahl der Neuinfektionen betrug 2,7 Millionen und insgesamt starben 2 Millionen Menschen an der HIV-Pandemie (UNAIDS, 2009). In Deutschland wurden seit Beginn der Erhebungen im Jahr 1993 knapp 74 000 Menschen mit positivem HIV-Test gezählt und die Zahl der geschätzten Fälle an der Immunschwächekrankheit AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) liegt bei 1100 pro Jahr (RKI, 2009).

Unbehandelt erkranken in Abhängigkeit von den jeweils verwendeten diagnostischen Standards zwischen 7% und 40% aller HIV-Infizierten an einer HIV-Demenz (Bacellar et al., 1994). Dieses sehr schwere Krankheitsbild, das oft den Beginn des AIDS-Stadiums markiert, führt unter Entwicklung von kognitiven, motorischen und emotionalen Einschränkungen bis hin zu Lähmungen, Inkontinenz und Koma innerhalb weniger Monate zum Tod.

Während manche Studien sogar von einem Ansteigen der neurologischen Symptome unter der hoch aktiven antiretroviralen Therapie (HAART) berichten (Clements et al., 2008), geben die meisten Autoren einen Abfall der Prävalenz der HIV-Demenz unter HAART an. Einigkeit herrscht jedoch in dem Punkt, dass die HAART die HIV-Demenz nicht in demselben Maße wie andere AIDS definierende Erkrankungen zu unterdrücken vermag (Dore et al., 1999).

Dazu kommt, dass das HI-Virus aufgrund seiner hohen Mutationsrate eine ausgesprochen große Zahl an resistenten Stämmen hervorbringt. Schon heute beträgt die Übertragung resistenter Viren in Europa 10% (Wensing et al., 2006) und es ist absehbar, dass sich diese Rate in Zukunft weiter drastisch erhöhen wird. Deshalb wird unter Hochdruck an der Entwicklung neuer Pharmaka geforscht, deren Liquorgängigkeit und damit auch deren Wirkung auf die HIV-Demenz oft schlecht sind. Die neuen Fusionsinhibitoren zeigen z.B. gar keine zentralnervöse Wirkung (Mellgren, 2006).

Angesichts dieser Zahlen und der Tatsache, dass der Großteil der betroffenen Menschen weltweit gar keinen Zugang zu entsprechenden Medikamenten hat, wird die Bedeutung einer möglichst umfassenden Aufklärung der bis heute noch in weiten Teilen unverstandenen Mechanismen der Entstehung der HIV-Demenz und deren effektive Behandlung deutlich.

1.1 HIV

Das HI-Virus wird zur Familie der Lentiviren, einer Untergruppe der Retroviren, gezählt. Lentiviren, die auch zahlreiche Tierarten wie Schafe, Rinder, Katzen und Rhesusaffen befallen, verursachen Infektionen mit einem sehr langsamen Krankheitsverlauf. Diese enden unbehandelt meist tödlich und schließen starke Gewichtsabnahme und zentralnervöse Degeneration mit ein. Es werden zwei Unterformen des HIV beschrieben: das bei weitem häufiger vorkommende HIV-1 und das genetisch ein wenig anders aufgebaute HIV-2. Die durch beide Unterformen ausgelösten klinischen Symptome ähneln sich sehr (Abbas, Lichtman & Pillai, 2007). Der natürliche Wirt des HIV-1 ist der Schimpanse, der des HIV-2 der Mangabenaaffe. Obwohl die Tiere ein Leben lang infiziert bleiben, zeigen sie keinerlei Krankheitssymptome. Erst durch Überschreiten der Artengrenze zwischen Affe und Mensch erlangte das Virus seine pathogenen Eigenschaften.

1.1.1 Struktur und genetische Ausstattung des HIV

Kennzeichnend für Retroviren ist ihr RNA-Genom, das im Zytoplasma der infizierten Zelle durch die viruseigene reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben wird. Mit Hilfe des Enzyms Integrase wird die neu erstellte DNA in das Wirtsgenom eingebaut, so dass die Transkriptase der Wirtszelle die Information des ursprünglich viralen RNA-Genoms vervielfältigen kann. Auf diese Weise entsteht Messenger-RNA, die die Grundlage für die Herstellung neuer viraler Proteine bildet.

Das Virion besitzt einen Durchmesser von ca. 100 nm und ist von einer Phospholipid-doppelmembran umgeben (s. Abb. 1). In diese Hülle ist transmembran das Glykoprotein gp41 verankert, das nicht-kovalent mit dem externen Protein gp120 wechselwirkt. An der Innenseite der Membranhülle ist das p17-Matrixprotein befestigt. Im Inneren des HIV-Partikels findet sich das konisch geformte p24-Kapsid, welches zwei identische einzelsträngige RNA-Moleküle enthält. Die Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase befinden sich ebenfalls im Kapsid (Wyatt & Sodroski, 1998; Abbas, Lichtman & Pillai, 2007).

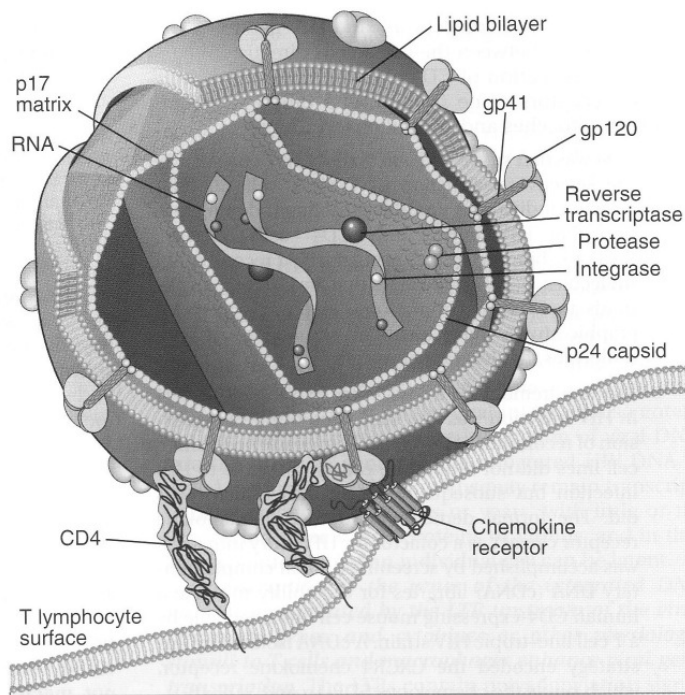


Abb. 1: Struktur von HIV-1: Ein HIV-1-Virion wird nahe einer T-Zelle gezeigt. HIV-1 besteht aus zwei identischen RNA-Strängen (das virale Genom) und assoziierten Enzymen, darunter die reverse Transkriptase, Integrase und Protease, die in einem konisch geformten Kern liegen. Dieser besteht aus dem p24-Kapsid Protein mit der es umgebenden p17-Proteinmatrix. Die äußerste Hülle bildet eine Phospholipid-doppelschicht (Lipid bilayer), der ursprünglich von der Wirtszelle stammt. Viral kodierte Membranproteine (gp41 und gp120) sind an die Doppelschicht gebunden. CD4- und Chemokin-Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle fungieren als HIV-1-Rezeptoren. (aus Abbas, Lichtman & Pillai, 2007, S.477).

Das RNA-Genom des HIV umfasst in etwa 9,2 Kilobasen und entspricht im Aufbau prinzipiell demjenigen aller Retroviren. Long terminal repeats an jedem Ende des Genoms regulieren die virale Genexpression, die Integration des viralen in das Wirtsgenom und die virale Replikation. Die gag-Sequenzen kodieren für strukturelle Kernproteine, die env-Sequenzen für die Glykoproteine gp120 und gp41, die für die Infektion der Zielzellen benötigt werden. Die pol-Sequenzen kodieren für die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease, die für die virale Replikation verantwortlich sind. Zusätzlich zu diesen für Retroviren typischen Genen besitzt das HIV-1 sechs spezifische regulatorische Gene: tat, rev, vif, nef, vpr und vpu, welche die virale Replikation auf verschiedene Weise steuern (Abbas, Lichtman & Pillai, 2007).

1.1.2 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion

HIV ist Auslöser von AIDS und wird durch ungeschützten Sexualkontakt, über infiziertes Blut bzw. Blutprodukte, prä- und perinatal sowie durch Stillen von der Mutter auf das Kind übertragen. Die Höhe der Viruslast der verschiedenen kontagiösen Körperflüssigkeiten beeinflusst das Übertragungsrisiko enorm (Rosenberg & Joliecoeur, 1997).

Nach dem Eintritt in den Körper gelangt das Virus direkt oder über Verletzungen der Schleimhaut in den Blutkreislauf, wo es gleich an der Eintrittsstelle als erstes Makro-

phagen infiziert. Diese wandern über die Lymphbahnen zu den Lymphknoten, wo es als weitere Zielzellen Monozyten und primäre T-Lymphozyten befällt. Diese Zellen lösen gleichzeitig die zelluläre und humorale Immunantwort aus. Das HI-Virus nutzt die Lymphknoten als Reservoir und wandert von dort zur weiteren Vermehrung in lymphatische Organe wie Milz und Tonsillen, aber auch in Gehirn und andere Organe (Pantaleo et al., 1993).

Der Verlauf der HIV-Infektion lässt sich in drei Phasen gliedern (s. Abb. 2): innerhalb der ersten Tage nach der Infektion kommt es zu einer massiven Virusvermehrung der aktivierten Lymphozyten in den Lymphknoten und einer Streuung des Virus in weitere Lymphorgane des ganzen Körpers. Gleichzeitig wird ein Abfall der Helferzellen beobachtet. In diesem akuten Stadium kann es zu einer Lymphadenopathie kommen. Häufiger sind Grippe- oder Mononukleose-artige Krankheitsbilder, die mit Fieber, Abgeschlagenheit, Durchfall und Neuralgie einhergehen können. Pharyngitis, Kopfschmerzen und Gelenkschmerzen treten ebenfalls manchmal auf. Oropharyngeale oder anogenitale Ulzerationen, ein makulopapulöses Exanthem sowie neurologische Symptome in Form einer Meningitis oder Neuropathie zählen auch zu den möglichen Erstsymptomen einer HIV-Infektion. In 70-80% der Fälle verläuft die Infektion jedoch völlig asymptomatisch. Diese anfängliche Virämie dauert meist mehrere Wochen an (Tindall & Cooper, 1991; Suttrop et al., 2004).

Zytotoxische T-Lymphozyten unterdrücken in diesem Anfangsstadium mit Hilfe von CD4+-T-Lymphozyten die Virusreplikation teilweise, so dass es wieder zu einer Reduktion der Viruslast und anschließender Erhöhung der CD4+-Zellzahl kommt, wodurch die im Schnitt 10 Jahre anhaltende klinische Latenzphase beginnt. Trotz der klinischen Beschwerdefreiheit führt die anhaltende Virusreplikation zu einem kontinuierlichen Abfall der CD4-positiven T-Lymphozyten und zu einer progredienten Zerstörung des lymphatischen Gewebes. Durch ständige Variation der Virusepitope entzieht sich das HI-Virus der immunologischen Kontrolle durch zytotoxische T-Lymphozyten.

Bereits bis zu 2 Jahre vor Eintritt in die dritte und letzte Phase der Erkrankung – das AIDS-Stadium – sinkt die Anzahl der CD4-positiven Zellen im Blut deutlich ab und die Virusmenge nimmt zu. Die Infizierten entwickeln unter Umständen ein lymphadenopathisches Syndrom, das in einen AIDS-related Complex übergehen kann, der sich durch Nachtschweiß, Fieber, Gewichtsverlust und erste AIDS-definierende Erkrankungen charakterisieren lässt. Manche Patienten verweilen über Jahre stabil in diesem Zwi-

schenstadium, bei einigen bilden sich die Symptome zunächst auch noch zurück und bei anderem wiederum geht dieser AIDS-related Complex schon nach wenigen Wochen in das Vollbild AIDS über.

Schließlich kann das HIV durch den fortschreitenden Verlust lymphatischen Gewebes nicht mehr im Netzwerk follikulär-dendritischer Zellen gebunden werden, die CD4-positiven Zellen sinken in dem Maße weiter ab, wie die Viruslast zunimmt und erste opportunistische Infektionen durch Pilze, Viren, Bakterien oder Protozoen bzw. maligne Tumoren lassen den Beginn des Vollbildes AIDS erkennen. In der Spätphase der Erkrankung klagen die Patienten auch zunehmend über neurologische Komplikationen, die sich bei einem Teil zur HIV-Demenz entwickelt (Price, 1996; Rosenberg & Joliecoeur, 1997; Suttorp et al., 2004).

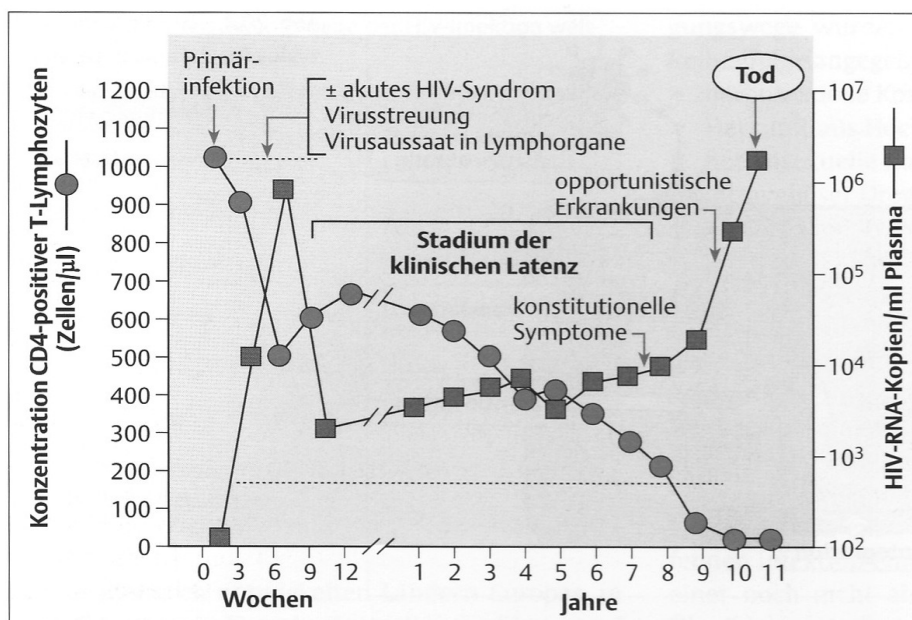


Abb. 2: Natürlicher Verlauf der HIV-Infektion (aus Suttorp et al., 2004, S.512, nach Fauci & Lane)

1.2 HIV-Demenz

Laut WHO erkranken ein Drittel aller HIV-infizierten Erwachsenen und die Hälfte aller infizierten Kinder an einer HIV-Demenz. Ungefähr 60% aller HIV-Infizierten zeigen neurologische Beeinträchtigungen. Die HIV-Demenz – auch AIDS-Demenz-Komplex, HIV-assoziiertes kognitiv/motorisches Komplex, Neuro-AIDS oder HIV-assoziierte Demenz genannt – stellt die Hauptursache für dementielle Erkrankungen bei Menschen unter 60 Jahren dar und zählt zu den AIDS definierenden Erkrankungen (Trujillo et al., 2005).

1.2.1 Klinischer Verlauf der HIV-Demenz

Die HIV-Demenz ist eine für HIV spezifische Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS): sie wird also nicht indirekt durch neurologische Komplikationen aufgrund opportunistischer Infektionen oder Tumoren ausgelöst. Bei der HIV-Demenz handelt es sich um eine subkortikale Demenz und die Infektion mit HIV ist Grundvoraussetzung für ihre Entstehung (Berger & Arendt, 2000).

In der Frühphase der Demenz ist besonders die psychomotorische Verlangsamung typisch, die für einen prognostisch negativen Krankheitsverlauf steht (Arendt et al., 1994). Außerdem kommt es zu Konzentrations- und Gedächtnisstörungen. Im weiteren Verlauf können affektive Symptome wie Apathie, Motivationsverlust, Depression und sozialer Rückzug beobachtet werden. Außerdem treten neurologisch-motorische Störungen wie Tremor, Bradykinese sowie Gang- und Haltungstörungen auf. Mit dem Fortschreiten der Demenz nehmen die kognitiven, affektiven und motorischen Beeinträchtigungen zu (Navia et al., 1986a). In der Endphase der HIV-Demenz kommt es zu Anfällen, Sprachstörungen, Halluzinationen, Inkontinenz und Koma. Die Patienten sterben im Durchschnitt 6 Monate nach Ausbruch der HIV-Demenz (Harrison & McArthur, 1995).

Nach Einführung der HAART kam es zu einer Abnahme der Inzidenz der HIV-Demenz und der Schwere ihrer klinischen Ausprägung (Ferrando et al., 1998). Allerdings kommt es durch die verbesserten Therapiemöglichkeiten auch zu einer verlängerten Lebenserwartung von HIV-Patienten, wodurch wiederum die Prävalenz der HIV-Demenz steigt (Clifford, 2000). Aufgrund der Stabilisierung der neurologischen Situation durch HAART tritt in den letzten Jahren eine zunehmend mildere Form der HIV-Demenz auf, die als „minor cognitive motor disorder“ (MCMD) bezeichnet wird (Ellis et al., 1997).

Der Zusammenhang zwischen der Höhe der Viruslast im Gehirn und klinischer Symptomatik ist bis heute unklar. Die meisten an HIV-Demenz erkrankten Patienten weisen zwar eine hohe Viruslast im Gehirn auf: diese korreliert aber nicht immer mit den klinischen Beschwerden (McArthur, 2004). Demuth et al. (2000) mutmaßen, dass die Schwere der Demenz nicht nur vom Ausmaß, sondern auch von der Dauer der Virusreplikation im parenchymalen Hirngewebe abhängig sein könnte. Natürlich sind sowohl Virulenzfaktoren des Virus wie z.B. dessen Zelltropismus oder bestimmte Gensequen-

zen als auch Wirtsfaktoren wie Immunantwort auf die Infektion und Expression virus-spezifischer Rezeptoren als mögliche Modulatoren denkbar (Zink et al., 1998).

1.2.2 Histopathologie der HIV-Demenz

Histopathologisch ist die HIV-Demenz durch Abblassung des Myelins und der Infiltration monozytärer Zellen in Form von Makrophagen und Mikroglia gekennzeichnet. Das vorherrschende histopathologische Merkmal der HIV-Demenz stellen die vielkernigen Riesenzellen (MNGCs: multi nucleated giant cells) dar. Sie entstehen vermutlich durch Fusion von Makrophagen und Mikroglia: infizierte Zellen exprimieren virale Glykoproteine auf ihrer Oberfläche, die an Rezeptoren auf nichtinfizierten Zellen binden (Masliah et al., 1996). Durch die von der Infektion verursachte Verletzung aktiviert das Gehirn Astrozyten (Astrozytose) und Mikroglia (Mikrogliose). Dadurch kommt es zur perivaskulären Anhäufung von Makrophagen und Lymphozyten, die als Mikrogliaknötchen in Erscheinung treten. Durch die zusätzliche Invasion von Lymphozyten vermehrt sich wiederum die Zahl der aktivierten Makrophagen, wodurch die entzündlichen Prozesse weiter verstärkt werden. Das Parenchym ist entweder unverändert oder zeichnet sich durch Schwammigkeit und Myelinverlust in oder um einen Herd aus (Gonzalez-Scarano & Martin-Garcia, 2005).

Die beschriebenen histopathologischen Schäden gelten zwar als spezifisch für die HIV-Demenz, sind aber als prognostischer Marker nicht sensitiv genug (Sopper et al., 2002).

1.2.3 Neuropathogenese der HIV-Demenz

Der genaue Ablauf der HIV-assoziierten Neuropathologie des Gehirns – der HIV-Enzephalitis (HIVE) – ist bis heute in weiten Teilen unklar. Derzeit geht man davon aus, dass das HI-Virus über infizierte CD4-positive Monozyten und perivaskuläre Makrophagen ins Gehirn eindringt (Albright, 2003). Eine andere Theorie besagt, dass das zellfreie Viruspartikel parazellulär zwischen den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke ins ZNS übertritt (Bobardt et al., 2004). Denkbar wäre auch, dass das Virus durch einen transzytotischen Prozess der Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke überwindet (Banks et al., 2001). Alternativ könnte das HI-Viruspartikel auch die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke infizieren, die dann neue Viren auf der Hirnseite freisetzen (Gonzalez-Scarano & Martin-Garcia, 2005). Nachdem die Infektion des Gehirns erfolgt ist, wird die Blut-Hirn-Schranke durch zahlreiche pathologische Veränderungen

so verändert, dass weitere Zellen wie z.B. Leukozyten einwandern können (Kramer-Hammerle et al., 2005).

Da Neuronen und Oligodendrozyten keinen CD4-Rezeptor an ihrer Zellmembran besitzen, können sie nicht direkt durch HIV infiziert werden. Astrozyten, die den größten Teil der Nervenzellen im Gehirn stellen, können zwar infiziert werden, aber das Virus kann sich nicht in ihnen vermehren (Takahashi et al., 1996). Die primären Zielzellen für die produktive HIV-Infektion im Gehirn sind die schon für das Eindringen des Virus wichtigsten Zellen: perivaskuläre Makrophagen und Mikroglia, die nur einen kleinen Teil aller Zellen im Gehirn ausmachen (Anderson et al., 2002).

Mikroglia stammen von knochenmarkähnlichen Zellen aus der Peripherie ab (Benveniste, 1997) und in ihrer Oberflächenstruktur gleichen sie anderen mononukleären Phagozyten (Guillemin & Brew, 2004). Aktivierte Mikroglia wandeln ihre ursprünglich verzweigte in eine amöboide Erscheinungsform um (Fetler & Amigorena, 2005) und werden in ihrer überaktivierten Form neben der HIV-Demenz auch mit Erkrankungen wie Multipler Sklerose, M. Alzheimer und M. Parkinson in Verbindung gebracht (Block & Hong, 2005). Die lang gestreckten flachen perivaskulären Makrophagen finden sich meist in der Nähe kleinerer Gefäße im Gehirn (Ulvestad et al., 1994). Sie haben als erste Zellen Kontakt zu einwandernden infizierten Zellen und werden deshalb als hauptverantwortlich für die Etablierung der HIV-Infektion im Gehirn angesehen (Gartner, 2000). Da die nicht besonders langlebigen Makrophagen stets durch neue ersetzt werden müssen, wird auch die ständige Einwanderung infizierter Zellen unterstützt. Die Lebenserwartung der Mikroglia liegt bedeutend über derjenigen der Makrophagen: sie sind aus diesem Grund auch mehr für die Aufrechterhaltung der latenten Infektion verantwortlich (Gonzalez-Scarano & Martin-Garcia, 2005).

Nachdem infizierte Makrophagen und Mikroglia das Gehirn befallen haben, schädigen sie Neurone und Astrozyten direkt durch ihre toxisch wirkenden Proteine Gp120, Tat und Vpr. Eine weitere direkte Schädigung geschieht durch die Sekretion von potentiell neurotoxischen Substanzen wie Quinolinsäure, Glutamat, Arachidonsäure, Stickoxide, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und freie Sauerstoffradikale, die bis zum Zelltod führen können. Insgesamt werden jedoch indirekte Mechanismen und Inflammation als entscheidender für die Neurodegeneration im Rahmen der HIVE eingeschätzt. Zusammen mit ebenfalls von Makrophagen und Mikroglia freigesetzten Zytokinen wie z.B. Il-1

oder Il-6, Virusproteinen und Chemokinen bewirken die oben beschriebenen Substanzen indirekt weitere inflammatorische und neurotoxische Prozesse. Sie fördern ebenfalls die weitere Aktivierung von Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten. Die aktivierten Astrozyten wiederum erhöhen die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, so dass Leukozyten ins ZNS einwandern können. Darüber hinaus setzen sie proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , die ihre eigene neuroprotektive Funktion hemmen und so die entzündlichen Prozesse weiter verstärken (Gonzalez-Scarano & Martin-Garcia, 2005).

Eine der wichtigsten protektiven Funktionen der Astrozyten besteht in der Aufnahme von Glutamat (Danbolt, 2001). Wenn sich die extrazelluläre Konzentration von Glutamat zu sehr erhöht, wirkt dieser Transmitter durch seine exzitatorischen Eigenschaften schädigend auf Neurone, was bis zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose führen kann. Somit verhindern Astrozyten physiologisch diesen als glutamaterge Exzitotoxizität (s. auch 1.4.2.1.4) bezeichneten Prozess, der als einer der zentralen neurodegenerativen Mechanismen der HIV-Demenz angesehen wird.

Zugleich wurde bei durch das simiane Immundefizienz-Virus (SIV) infizierten Makakken eine Reduktion des hemmend wirkenden Neurotransmitters Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) gefunden. Auch das dopaminerge System ist bei der Ausbildung der HIVE beteiligt (s. 1.4.2.2) (Koutsilieri et al., 1999; Kaul et al., 2001; O'Donnell et al., 2006).

1.2.4 Pharmakologische Behandlung der HIV-Demenz

HIV im fortgeschrittenen Stadium – und damit auch die HIV-Demenz – wird heutzutage mittels HAART behandelt. Sie besteht aus drei oder mehr Medikamenten mindestens zweier verschiedener Substanzklassen – klassischerweise eine Dreifach-Kombination aus verschiedenen Inhibitoren der reversen Transkriptase und/oder der Protease von HIV. Auch wenn dies die bislang effektivste Methode zur Versorgung von HIV-Infizierten darstellt, sind die Ergebnisse bezüglich der HIV-Demenz immer noch verbesserungsbedürftig: die Prävalenz der HIV-Demenz sank mit Einführung der HAART zwar, aber bei weitem nicht in dem Maße, wie andere AIDS-definierende Erkrankungen (Dore et al., 1999). Zudem lässt sich bei ungefähr der Hälfte der Patienten mit neurologischen Symptomen unter HAART kein Langzeiterfolg verzeichnen. Die dem M. Parkinson ähnlichen Beschwerden der HIV-Demenz werden scheinbar durch die HAART

auch nicht verbessert (Mirsattari et al., 1998). Auch die Dopaminkonzentration im Liquor vermag die HAART nicht auszugleichen (Gisslen et al., 1994).

Eine mögliche Ursache für die ungenügende Wirksamkeit der HAART auf die HIV-Demenz könnte darin liegen, dass das Gehirn durch die Blut-Liquor-Schranke so gut geschützt ist, dass die Medikamente sie kaum passieren können. So kann es unter der HAART auch passieren, dass das Gehirn sogar als Virusreservoir mit der Möglichkeit der Bildung resistenter Virenstämme dient (Ellis et al., 2000).

Als weitere Erklärung für die relative Unwirksamkeit der HAART auf die HIV-Demenz bietet sich die Tatsache an, dass die Entstehung der HIV-Demenz nicht nur auf dem Vorhandensein des HI-Virus im Gehirn, sondern auch auf Exzitotoxizität (s. 1.4.2.1.4) und oxidativem Stress (Steiner et al., 2006) beruht. Auch in vorliegender Arbeit wurden u.a. neurologisch wirksame Substanzen getestet, die auf diese Pathomechanismen wirken. Es wurde die Wirkung des Antiparkinsonmedikaments Selegilin, des Antidementivums Memantin und der Antioxidantien N-Acetylcystein (NAC) und Melatonin analysiert. Die bisherigen Therapieversuche der HIV-Demenz mit Selegilin, das den Dopaminabbau verzögert, waren nicht sehr ermutigend: in einem Rattenmodell wurde bereits gezeigt, dass durch Selegilin eine Erhöhung der Viruslast sowie eine Aktivierung der Mikroglia ausgelöst wurde (Czub et al., 1999). Auch im SIV/Rhesusaffenmodell induzierte Selegilin neuropathologische Veränderungen, eine Verstärkung der Virusreplikation als auch eine erhöhte Produktion des potentiell neurotoxischen Zytokins TNF- α (Czub et al., 2004). Dennoch konnte in einer Studie am Menschen durch eine direkte Gabe von L-Dopa die Parkinson-Symptomatik bei an HIV-Demenz Erkrankten verbessert werden (Mintz et al., 1996), so dass der Ansatz mit Selegilin unter Umständen doch noch Erfolg versprechend sein könnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird analysiert, welchen Einfluss Selegilin auf die glutamatergen Synapsen im Verlauf der SIV-Enzephalitis ausübt.

Memantin – ein nichtkompetitiver Antagonist der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) – ist in Europa und in den USA zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung zugelassen (Reisberg et al., 2006). In einer bereits an HIV-Patienten durchgeführten klinischen Studie konnte zwar keine Verbesserung der kognitiven Funktionen nachgewiesen werden, jedoch schien der neuronale Stoffwechsel effektiver zu arbeiten (Schiffitto et al., 2007). Auch wenn bisher nur wenige Daten zu Memantin hinsichtlich seiner Eignung zur Behandlung der HIV-Demenz erhoben wurden, sind die ersten Ergebnisse doch sehr Erfolg versprechend. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb die Auswir-

kung von Memantin auf die glutamaterge Synapse sowie die Immunaktivierung bei HIV-Enzephalitis untersucht.

Eine Behandlung mit Antioxidantien stellt eine weitere interessante Therapieoption für an HIV-Demenz erkrankte Patienten dar. Sie sollen dem an der Entwicklung der HIV-Demenz beteiligten oxidativen Stress (s. oben) entgegen wirken. Für die in dieser Arbeit angewendeten Substanzen NAC, Melatonin und auch Selegilin konnte in verschiedenen Studien bereits eine antioxidative Wirkung festgestellt werden (Foley et al., 2000; Andoh et al., 2005).

1.3 Das SIV/Rhesusaffen-Modell

Auch wenn die Symptome der HIV-Demenz erst im Spätstadium der HIV-Infektion auftreten, erfolgt die Schädigung des Zentralnervensystems vermutlich schon zu Beginn der Infektion. Zur Entwicklung neuroprotektiver Therapieansätze sowie zur Bestimmung des optimalen Zeitpunkts ihres Einsatzes ist das Verständnis des neuropathologischen Prozesses der HIV-Demenz bzw. Medikamentenstudien im Anfangsstadium der Erkrankung unerlässlich.

Klinische Untersuchungen am Menschen hierzu sind problematisch, da vielen HIV-Infizierten ihre Erkrankung in der frühen Phase noch gar nicht bekannt ist. Doch selbst wenn die Betroffenen schon von ihrer Infektion unterrichtet sind, ist ihnen doch meist der genaue Zeitpunkt der Infektion unbekannt. Der Hauptgrund für die ungünstigen Studienbedingungen an Versuchspersonen ist jedoch die Tatsache, dass sich Biopsien am menschlichen Gehirn aus ethischen Gründen selbstverständlich verbieten. Nur in Ausnahmefällen war es bisher möglich, Autopsiematerial von in der asymptomatischen Phase verstorbenen Patienten zu gewinnen.

Deshalb ist man gezwungen, auf das SIV/Rhesusaffen-Modell zurückzugreifen. Da das durch SIV beim Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) dem durch HIV beim Menschen hervorgerufenen Krankheitsbild sehr ähnelt, eignet sich dieses Modell besonders gut, um Rückschlüsse auf den Menschen zu ziehen (Joag, 2000; Lackner et al., 1994).

Als natürliche Wirte des SI-Virus gelten die grüne Meerkatze, Paviane und Mangabaffen. Wie für den Menschen auch ist für sie SIV nicht infektiös. Bei einer Übertragung auf andere Affenarten – wie z.B. den für diese Arbeit verwendeten Rhesusaffen – kommt es zu einer Immunschwächeerkrankung, die nahezu mit denselben klinischen

Symptomen wie die HIV-Infektion und im weiteren Verlauf die AIDS-Erkrankung des Menschen einhergeht. Insbesondere die HIV-Demenz beim Menschen spiegelt sich in sehr ähnlichen neurologischen Erscheinungen der SIV-Enzephalitis der Makakken wider (Burudi & Fox, 2001). Aber auch die laborchemischen Parameter der Immundefizienz des HI- und des SI-Virus ähneln sich sehr (Letvin & King, 1990).

Diese große Ähnlichkeit der Symptome beruht darauf, dass HIV und SIV zur selben Untergruppe der Lentiviren gehören und deshalb strukturell und funktionell eng verwandt sind. So besteht zwischen beiden Viren große Übereinstimmung in der Organisation ihres Genoms sowie ihrer Gensequenzen (Hahn et al., 2000). Die hohe Sequenzhomologie ist zwischen SIV und HIV2 noch stärker ausgeprägt als zwischen SIV und HIV1. Sowohl SIV als auch HIV2 besitzen das vpx-Gen, das in HIV1 durch das vpu-Gen ersetzt ist. Die Zielzellen beider Virenstämme sind ebenfalls identisch: sie docken an CD4+ exprimierende Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen sowie dendritischen Zellen an (Desrosiers, 1990).

Im Gegensatz zur HIV-Infektion führt die experimentell induzierte SIV-Infektion zunächst nicht zu einer spezifischen T-Zell-Antwort (Dittmer et al., 1994). Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es aber wie beim HIV-infizierten Menschen zu einer vermehrten Abnahme CD4-positiver Zellen und folglich auch zu einer steigenden Anfälligkeit für opportunistische Infektionen und Tumore (Letvin & King, 1990). Die durch SIV hervorgerufene Erkrankung lässt sich wie bei der HIV-Infektion des Menschen in die drei klinischen Stadien akute Phase, asymptomatische Phase und AIDS einteilen (Hirsch & Johnson, 1994).

Das SIV/Rhesusaffen-Modell bietet die Möglichkeit, den Krankheitsverlauf systematisch zu dokumentieren und zu jedem beliebigen Zeitpunkt der Infektion Proben von Blut, Urin, Liquor, Gewebe des Gehirns und weiteren Organen zu entnehmen. Weiterhin werden kontrolliert bestimmte Virenstämme mit einer genau bekannten Gensequenz appliziert: dadurch kann der Einfluss einzelner Gene auf den Infektionsverlauf im Allgemeinen und die HIV-Demenz im Speziellen untersucht werden (Norley & Kurth, 1997).

Darüber hinaus können Medikamente und neue Impfstoffe an den Tieren getestet und so die Wirkungen abgeschätzt bzw. unerwünschte Wirkungen erkannt werden. Die Optimierung der Dosis, Art und Dauer der Anwendung neuer Medikamente stellt ebenfalls

eine sinnvolle Nutzung des Tiermodells dar (Joag, 2000). Die typischen HAART-Medikamente, die speziell gegen die vom HI-Virus des Menschen gebildete Enzyme gerichtet sind, zeigen natürlich beim SIV-infizierten Rhesusaffen keinerlei Wirkung. Vielmehr ist das Makakken-Modell zur Erprobung potentiell neuroprotektiver Arzneistoffe bestens geeignet.

Wie auch beim HIV-infizierten Menschen erfolgt die Infektion des Gehirns bei den mit SIV infizierten Makakken sehr früh, meist schon innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Infektion (Lackner, 1991; Sasseville & Lackner, 1997). Erste histopathologische Veränderungen der SIV-Enzephalitis sind perivaskuläre Makrophageninfiltrate, vielkernige Riesenzellen, und Mikrogliaknötchen. Sie finden sich hauptsächlich in der weißen Substanz, den Basalganglien und der Pons (Zink et al., 1998; Sopper et al., 2002). Eine starke Vermehrung von Astrozyten um die Makrophageninfiltrate – die sog. reaktive Astrozytose – kann häufig beobachtet werden. Virales Antigen reichert sich stark in Mikrogliaknötchen, Riesenzellen, parenchymalen Mikrogliazellen und peripheren Makrophagen an (Czub et al., 1996). Illustriert werden die beschriebenen histopathologischen Veränderungen in Abb. 3:

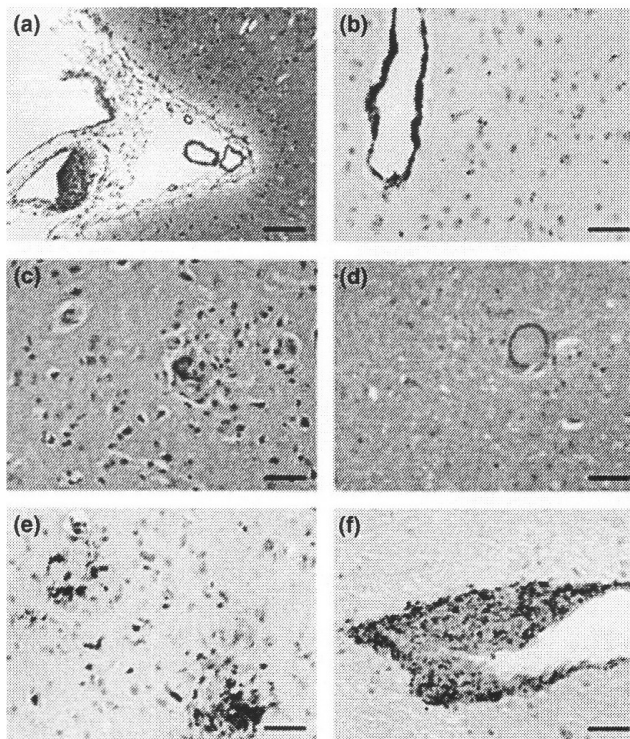


Abb. 3: Neuropathologische Kennzeichen der SIV-Enzephalitis. (a) Meningitis mit perivaskulärer entzündlicher Infiltration, (b) perivaskuläre aktivierte Mikrogliazellen; (c) Mikrogliaknötchen mit einer vielkernigen Riesenzelle; (d) einzelne vielkernige Riesenzelle als Anzeichen zerebraler SIV-Infektion; (e) erhöhte Anzahl aktivierter Mikrogliazellen in Mikrogliaknötchen oder in (f) großer perivaskulärer entzündlicher Infiltration (aus Meisner, Neuen-Jacob et al., 2008).

Indirekt lässt sich der neuronale Zellverlust im Rahmen der SIV-induzierten Enzephalitis durch eine Reduktion der Konzentration von N-Acetylaspartat in Hirnhomogenaten (Tracey et al., 1997) sowie einer Atrophie des Hippokampus (Luthert et al., 1995) nachweisen.

Die Infektion schreitet im SIV-Modell wesentlich schneller fort als die HIV-Infektion beim Menschen. Bei ungefähr einem Drittel aller Tiere kann man einen schnellen Krankheitsverlauf feststellen: diese „rapid progressors“ sterben innerhalb des ersten Jahres nach der Infektion. Der Rest der Versuchstiere überlebt durchschnittlich zwischen 8 Monaten und 2 Jahren (Sopper et al., 2002).

Im Gegensatz zur HIV-Infektion beim Menschen gehört eine Abblassung des Myelins eher zu den seltenen histopathologischen Veränderungen bei den SIV-infizierten Rhesusaffen (Budka, 1991; Rausch et al., 1994). Auch die Gliose findet sich wesentlich häufiger und stärker ausgeprägt bei Menschen mit HIV (Sharer, 1994; Lipton & Gendelman, 1995). Außerdem sucht man bei infizierten Makakken für gewöhnlich vergeblich nach Zeichen einer Myelopathie oder peripheren Neuropathie (Price, 1996).

Ebenso wie beim Menschen kommen im Rhesusaffen-Modell auch kognitive und motorische Einschränkungen vor (Murray et al., 1992). Die klinische neurologische Symptomatik ist bei den Affen dagegen nur sehr gering ausgeprägt. Erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium kann man bei den Versuchstieren deutliche neurologische Symptome wie Ataxie, Lethargie, Blindheit, Epilepsie und Lähmungen beobachten (Zink et al., 1997).

Neben den genannten Unterschieden zum Verlauf der menschlichen HIV-Infektion besteht ein weiterer Nachteil des Tiermodells darin, dass der Krankheitsverlauf bis zum Ausbruch von AIDS sehr lang ist (zwischen einem und drei Jahre). Zum anderen erkrankt nur ein relativ geringer Prozentsatz von ca. 25% der Rhesusaffen wirklich an SIV-Enzephalitis (Williams et al., 2008). Diese Nachteile wirken sich jedoch in erster Linie auf die Kosten und den Zeitaufwand der Forschung aus, jedoch nicht auf die Qualität des SIV/Makakkenmodells. Auch die aufgeführten Unterschiede zum Menschen beeinträchtigen die Aussagekraft des SIV/Makakkenmodells kaum. Es ist ausgezeichnet dafür geeignet, die Neuropathogenese und die Genetik der HIV-Demenz zu untersuchen.

Dennoch gibt es mittlerweile Versuche der Weiterentwicklung dieses Modells, die statt Rhesusaffen beispielsweise südliche Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) verwenden, da diese für durch SIV verursachte Hirnläsionen anfälliger sind. Es wird statt mit dem in der vorliegenden Arbeit vorwiegend eingesetzten makrophagotropen Virus SIV-

mac251 MPBMC mit einer Kombination aus zwei verschiedenen Viren pro Versuchstier gearbeitet: dem neurovirulenten makrophagotropen SIV17E-Br und dem immunsuppressiven und gemischt lympho- und makrophagotropen Virus SIV/DeltaB670. Der Vorteil dieses Modells besteht in einem schnelleren Infektionsverlauf und einer höheren Rate an Versuchstieren mit neuronalen Schäden: schon durchschnittlich drei Monate nach der Infektion zeigten sich bei ca. 90% der Affen neuronale Schäden (Mankowski et al., 2002; Zink & Clements, 2002; Clements et al., 2008). Auch wenn diese Ergebnisse sehr viel versprechend klingen, muss wohl erst noch abgewartet werden, inwieweit sich dieses Modell längerfristig in der Praxis bewährt.

1.4 Basalganglien

In elektrophysiologischen, pathologischen, radiologischen, biochemischen und virologischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Basalganglien zu den Hauptzielen der HIV-Infektion im Gehirn gehören (Berger & Arendt, 2000). Dazu kommt, dass Thalamus, ventrales Mittelhirn und Basalganglien die Hirnregionen mit der höchsten Viruslast sind (Wiley et al., 1998). Auch die klinischen Symptome der HIV-Demenz wie z.B. Einschränkungen der Psychomotorik, Antriebslosigkeit und Störungen des Gangbildes, erinnern sehr an die Parkinson-Erkrankung, deren Ursache ebenfalls in den Basalganglien lokalisiert ist (Koutsilieri et al., 2002a).

1.4.1 Funktionelle Anatomie des Putamen und Nucleus Accumbens als Teile des Striatums

Die Basalganglien bestehen im engeren Sinn aus zwei Kernen im Marklager des Großhirns: dem Striatum und dem Pallidum (= Globus Pallidus). Das Striatum gliedert sich wiederum in den Nucleus caudatus, das Putamen und den Nucleus Accumbens. Meist wird der Begriff der Basalganglien jedoch weiter gefasst und funktionell um zwei motorische Kerne erweitert: den Nucleus subthalamicus und die Substantia nigra (s. Abb. 4).

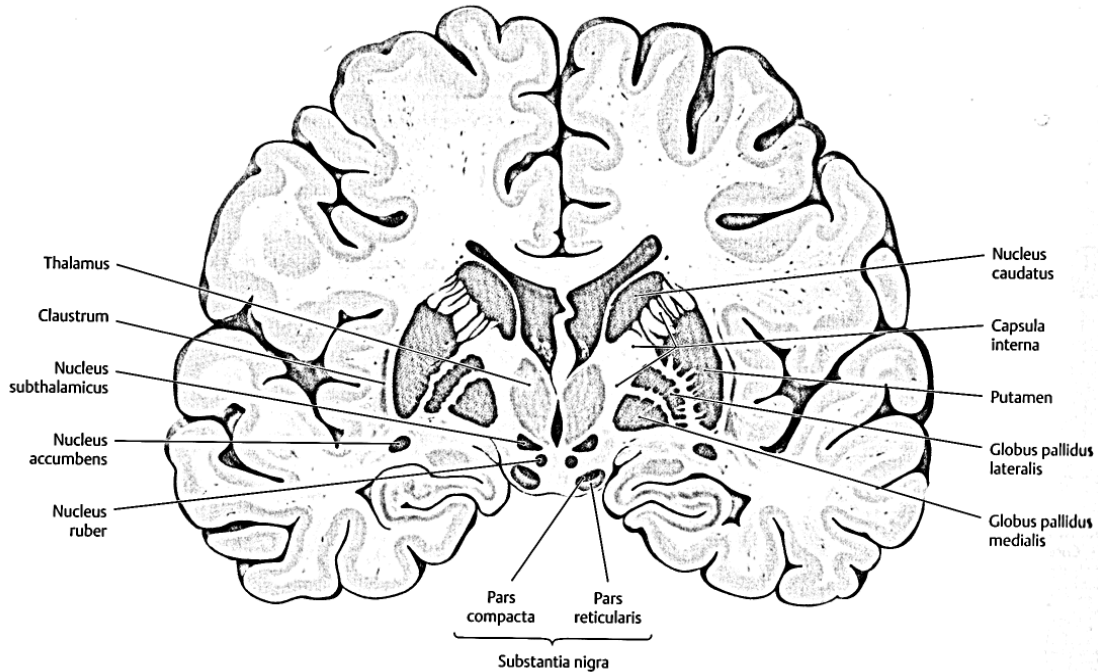


Abb. 4: Koronarschnitt eines menschlichen Gehirns, u.a. mit Darstellung der Basalganglien, des Nucleus Accumbens und des Putamen (aus Schünke et al., 2009, S.412).

Die Capsula interna, ein Faserbündel, das zwischen dem Neocortex und dem Thalamus verläuft, trennt das Striatum in Putamen und Nucleus Caudatus. Der Nucleus Accumbens ist ein relativ kleiner Abschnitt im ventrorostralen Bereich des Striatums, wo Nucleus caudatus und Putamen miteinander verschmelzen.

Das Striatum kann als zentrale Schaltstelle motorischer Impulse betrachtet werden, die vor allem inhibitorischen Charakter hat. Afferent innerviert wird das Striatum zum einen vom Kortex: motorischer, sensorischer und präfrontaler Assoziationskortex entsenden ihre erregenden glutamatergen Fasern hauptsächlich aus der ipsilateralen Hirnhälfte. Zum anderen projizieren nigrostriatale – aus Substantia nigra und Thalamus stammende – Neurone vor allem hemmend auf die GABAergen efferenten striatalen Neurone. Dies geschieht zum Teil über acetylcholinerge Interneurone im Striatum, die erregend auf efferente striatale Neurone wirken. So ist die Substantia nigra in der Lage, direkt und indirekt die efferente Aktivität des Striatums zu hemmen. Veranschaulicht dargestellt werden die Transmitter der afferenten Verschaltungen im Striatum in Abb. 5:

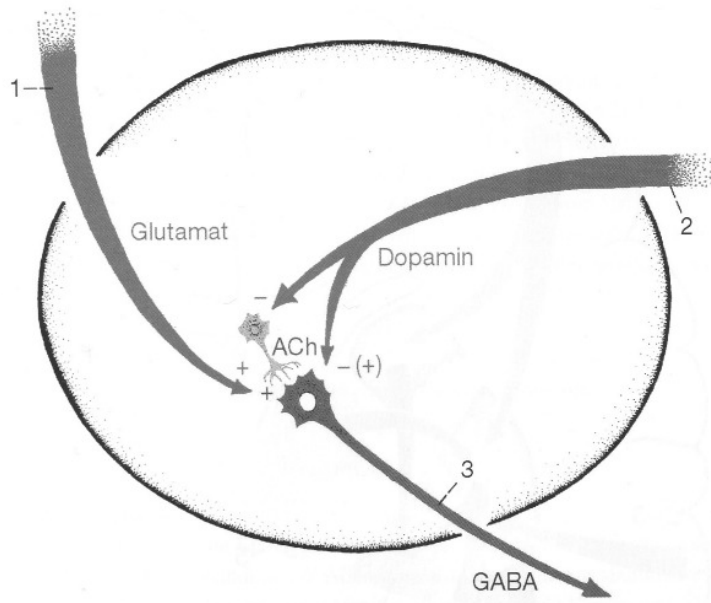


Abb. 5: Transmitter der afferenten Verschaltungen im Striatum: 1 Glutamaterge Fasern aus dem Kortex und 2 dopaminerge Fasern aus der Substantia nigra projizieren im Striatum auf die 3 GABAergen striatalen Ausgangsneurone (aus Trepel, 2008, S. 223).

Die Efferenzen des Striatum werden auf das Pallidum und die Substantia nigra projiziert. Durch ihren hauptsächlich vorhandenen Neurotransmitter GABA wirken diese efferenten Faserbündel inhibitorisch.

Von der Substantia nigra wiederum wird das Striatum selbst gehemmt, so dass zwischen diesen beiden motorischen Kernen eine negative wechselseitige Rückkopplung besteht.

Funktionell betrachtet werden dem Striatum also über kortikostriatale Faserzüge motorische Impulse zugeleitet. Das Striatum bearbeitet diese motorische Information vorwiegend inhibitorisch, d.h. es unterdrückt über seine Verbindungen zum Pallidum Bewegungsimpulse. Thalamus und Substantia nigra greifen fördernd und hemmend auf diese motorische Hemmfunktion des Striatums ein (Trepel, 2008; Bolam et al., 2000).

Der Nucleus Accumbens besitzt ähnliche Faserverbindungen wie der restliche Teil des Striatums. Es fällt jedoch eine besonders intensive afferente Verknüpfung zu Teilen des limbischen Systems auf. Er wird deshalb auch zum mesolimbischen dopaminergen System gezählt und ist als wichtiger Teil des Belohnungssystems an motivationalem und emotionalem Verhalten sowie der Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen wie z.B. der Schizophrenie beteiligt (Tekin & Cummings, 2002).

Vom Hippokampus, präfrontalen Kortex, Amygdala sowie den Kerngebieten des Thalamus verlaufen afferente glutamaterge Bahnen zum Nucleus Accumbens. Des Weiteren erhält er dopaminerge Projektionen aus der Substantia nigra pars compacta und der Area ventralis tegmentalis. Der Nucleus Accumbens entsendet efferente Fasern zum dorsalen und ventralen Pallidum, der Substantia nigra pars reticulata, den Globus pallidus pars medialis und der Area ventralis tegmentalis (Gerfen & Wilson, 1996).

Typische neuropsychiatrische Symptome der HIV-Demenz sind manische Zustände, Angstzustände, Apathie und psychotische Störungen (Koutsilieri et al., 2002b). Da dies sehr gut mit der Rolle des Nucleus Accumbens als Vermittler zwischen sensorischer potentiell belohnungswürdiger Reize und motorischem System zu vereinbaren ist, wurde diese Gehirnregion in vorliegender Arbeit zu gleichen Teilen neben dem Putamen analysiert.

Das medial des Putamen gelegene Pallidum teilt sich in ein mediales (inneres) und ein laterales (äußeres) Pallidumsegment. Es enthält seine Afferenzen vom Striatum, dem Nucleus subthalamicus und dem Thalamus. Efferenzen entsendet das Pallidum hauptsächlich zum Thalamus und dem Nucleus subthalamicus, mit dem es reziprok verbunden ist. Vereinfacht kann das Pallidum als Gegenspieler des Striatum gesehen werden. Während das Striatum insgesamt eher inhibitorisch auf Bewegungsimpulse wirkt, fördert der Globus pallidus diese im Allgemeinen eher. Einschränkend muss aber festgestellt werden, dass das mediale Pallidumsegment eher hemmend, das laterale Pallidumsegment eher fördernd auf Bewegungen wirkt (Trepel, 2008).

Einen Gesamtüberblick über die Verschaltungen der Basalganglien gibt Abb. 6:

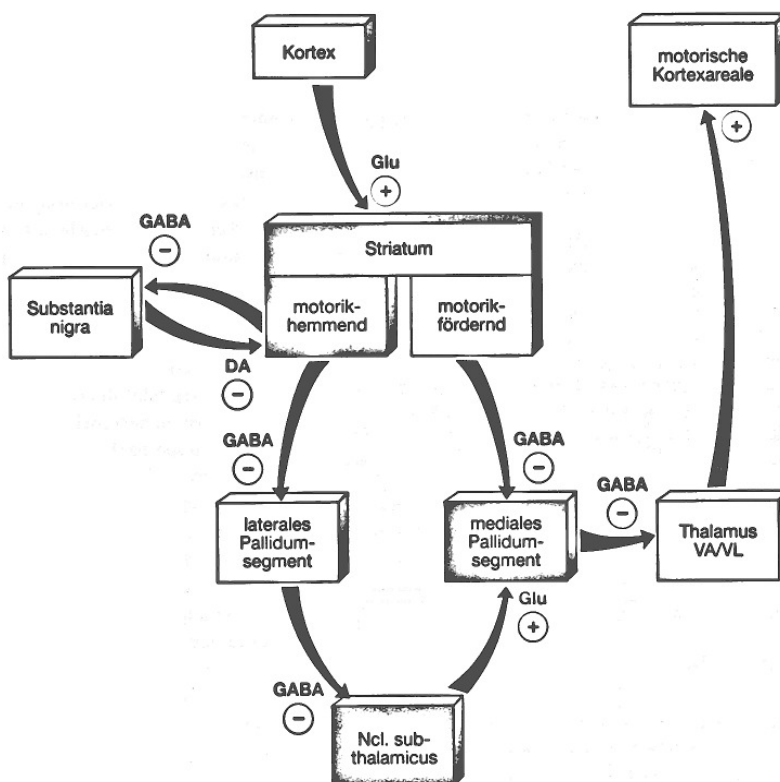


Abb. 6: Verschaltungen der Basalganglien und die beteiligten Transmitter. + steht für erregende, - für hemmende Projektionen. Hemmende Bahnen sind dunkler, erregende heller dargestellt. Dunkel unterlegte Kästchen stellen ein motorik-hemmendes, hell unterlegte Kästchen ein motorik-förderndes Zentrum dar. **DA** = Dopamin, **GABA** = Gamma-Aminobuttersäure, **Glu** = Glutamat, **VA/VL** = Nucleus ventralis antero-lateralis des Thalamus (aus Trepel, 2008, S. 227).

Die vom Kortex zum Striatum ziehenden Bahnen wirken durch den Transmitter Glutamat erregend. Das Striatum besteht aus zwei funktionell antagonistischen Teilen, die zwar beide Faserzüge mit dem hemmenden Neurotransmitter GABA entsenden, sich aber in ihren jeweiligen Zielgebieten unterscheiden: ein Teil des Striatums projiziert in das mediale, der andere in das laterale Pallidumsegment. Der Transmitter der efferenten pallidalen Neurone besteht auch aus GABA, ist also ebenfalls inhibitorisch in seiner Wirkung. Das mediale Pallidum projiziert direkt in den Nucleus ventralis anterolateralis – den spezifischen Thalamuskern für motorische Kortexareale. Das mediale Pallidumsegment hat also eine hemmende Funktion auf motorische Impulse.

Das laterale Pallidumsegment innerviert inhibitorischen den Nucleus subthalamicus, der wiederum mittels Glutamat exzitatorisch mit dem medialen Pallidumsegment verbunden ist. Auf diese Weise aktiviert er den motorikinhibitorischen Teil des medialen Pallidumsegments. Dabei wird der Nucleus subthalamicus aber vom lateralen Pallidumsegment kontrolliert, so dass diesem eine bewegungsfördernde Funktion zugeschrieben werden kann.

Neben dem eben beschriebenen Hauptfluss der Informationsverarbeitung spielt auch die Substantia nigra eine sehr wichtige Rolle: mit ihren dopaminergen Neuronen hemmt sie im Striatum den Anteil, der motorische Impulse inhibiert. Zusätzlich aktiviert sie mit einigen Fasern auch den Anteil des Striatums, der motorische Impulse bahnt. Daraus wird ersichtlich, dass die Substantia nigra einen eindeutig fördernden Einfluss auf motorische Impulse ausübt. Deshalb führt der Ausfall der Substantia nigra beim Parkinson-Syndrom zur typischen Bewegungsarmut der Patienten (Trepel, 2008).

1.4.2 Neurotransmittersysteme

Im Folgenden soll nur auf die beiden für die Neurotoxizität wichtigsten Transmittersysteme der Basalganglien – dem glutamatergen und dopaminergen System – eingegangen werden.

1.4.2.1 Das glutamaterge System

Die Aminosäure L-Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Säugetiergehirn. Bis zu 90% aller Neuronen sind glutamaterg und Glutamat ist in die normalen Abläufe von Kognition, Gedächtnis und Lernen eingebunden (Fonnum, 1984).

1.4.2.1.1 Die glutamaterge Synapse

Glutamat besteht aus einem Kohlenstoffgerüst und einer Aminogruppe. Das Kohlenstoffgerüst leitet sich von der im Serum enthaltenen Glukose ab, die im Rahmen der Glykolyse zu α -Ketoglutarat umgesetzt wird. Auf diese Weise wird fast die gesamte im menschlichen Hirn vorhandene Glukose in Glutamat umgewandelt. Durch Transaminierung erhält α -Ketoglutarat eine Aminogruppe vorwiegend von den Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin, die die Blut-Hirnschranke leicht überwinden können, und wird so zu Glutamat. Beim Glutamatabbau wird die Aminogruppe des Glutamats mit Hilfe der Glutamat-Dehydrogenase als freies NH_3 und das verbleibende α -Ketoglutarat wieder in den Trikarbonsäurezyklus eingeschleust.

Die klassische glutamaterge Synapse ist entweder axo-dendritisch oder axo-axonal aufgebaut (Hassel & Dingledine, 2006).

Die Ausschüttung von Glutamat kann von vielerlei Quellen auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Die bekannteste Form der Glutamatausschüttung besteht in der Exozytose des in Speichervesikeln gelagerten Glutamats nach Depolarisation der Nervenendigung durch ein ankommendes Aktionspotential. Es mehren sich jedoch die Hinweise, dass der Großteil des Glutamats jedoch auf nicht-exozytotische Weise ausgeschüttet wird. Dies kann über bestimmte Transporter geschehen, die z.B. Glutamat gegen Aspartat, Cystin oder andere Komponenten austauschen (Jensen et al., 2000). Auch der vesikuläre glutamaterge Transporter (VGLUT) könnte eine entscheidende Rolle spielen. Eine letzte bisher kaum verstandene Möglichkeit ist der Ausstoß von Glutamat durch osmotisches Anschwellen der Zelle (Strange et al., 1996). Doch nicht nur Neurone und ihre Nervenendigungen, sondern auch Astrozyten können Glutamat durch Exozytose freisetzen (Attwell, 1994). Dieser Prozess wird von aktivierten Glutamatrezeptoren eingeleitet, ist kalzium-abhängig und wird von Prostaglandinen modifiziert. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass Glutamat nicht nur in den synaptischen Spalt, sondern auch in andere Kompartimente des Extrazellulärtraumes abgegeben wird (Danbolt, 2001).

Die Aufnahme von Glutamat in Zellen kann der Stoffwechselfunktion dienen (z.B. zur Proteinsynthese oder Energiegewinnung). In Nervenendigungen wird es jedoch meist als Transmitter wieder verwendet. Dort sammelt es sich in synaptischen Vesikeln mit Hilfe des VGLUT (V in Abb. 7), dessen treibende Kraft in einem durch protonenabhängige ATPasen aufgebauten elektrischen Gradienten über der Vesikelmembran liegt.

Anschließend wird das Glutamat durch Exozytose ATP- und kalziumabhängig in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Dieses ausgeschüttete Glutamat wird präsynaptisch (VI in Abb. 7) und postsynaptisch (I in Abb. 7), aber hauptsächlich extrasynaptisch (II in Abb. 7) von Astrozyten aufgenommen, wo es katalysiert durch die Glutaminsynthetase mit Ammoniak unter Verbrauch von ATP zu Glutamin umgesetzt wird. Das Glutamin wird anschließend von einem Glutamintransporter (III in Abb. 7) in den synaptischen Spalt sezerniert, wo es durch einen weiteren Glutamintransporter (IV in Abb. 7) von den Nervenendigungen aufgenommen wird. Dort wird es durch die Glutaminase wieder zu Glutamat umgewandelt. Dieser Austausch von Glutamat und Glutamin zwischen Neuronen und Astrozyten wird als Glutaminzyklus bezeichnet und gilt als der bedeutendste Stoffwechselweg zur Wiederherstellung von Glutamat. Schätzungsweise die Hälfte des in Neuronen gebildeten Glutamats wird zu Gliazellen transportiert. Glutamin hat im Gegensatz zu Glutamat keine neurotoxische Wirkung und ist auch nicht in der Lage, Rezeptoren zu aktivieren (Danbolt, 2001).

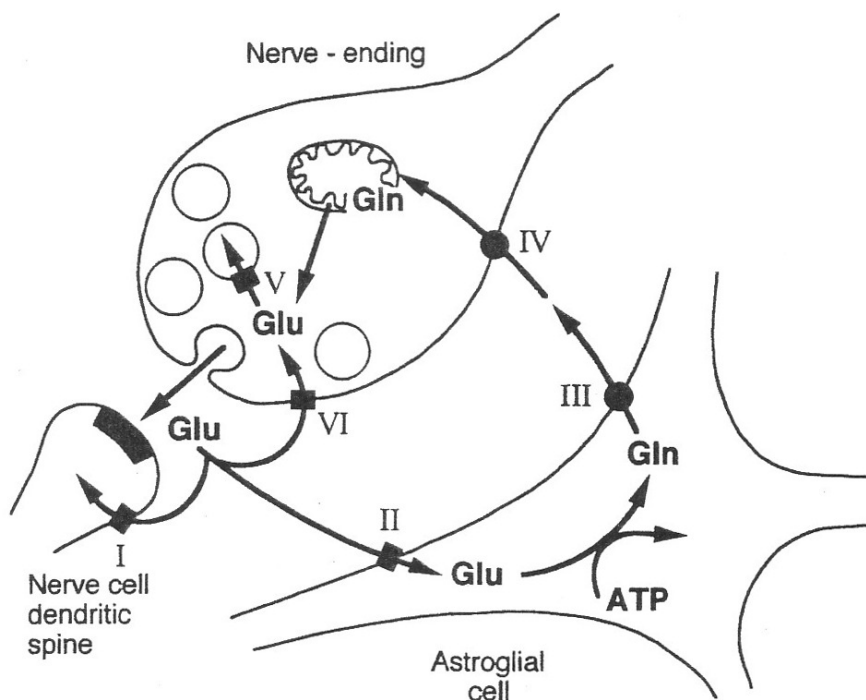


Abb. 7: **Der Glutamat-Glutamin-Zyklus.** I = postsynaptischer glutamaterger Transporter, II = extrasynaptischer glutamaterger Transporter auf astrozytärer Gliazelle, III = Glutamin auswärtstransporter der astroglialen Zelle, IV = Glutamin einwärtstransporter des Neurons, V = vesikulärer glutamaterger Transporter (VGLUT), VI = präsynaptischer glutamaterger Transporter (aus Danbolt, 2001).

1.4.2.1.2 Glutamatrezeptoren

Nachdem Glutamat exozytotisch aus der Präsynapse in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wurde, bindet es meist an einen spezifischen Glutamatrezeptor an der postsy-

naptischen Membran. Neben Axonen und Dendriten exprimieren auch Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia Glutamatrezeptoren (Hassel & Dingledine, 2006).

Derzeit unterscheidet man drei verschiedene Familien von Rezeptoren, die jeweils eine unterschiedliche Affinität zu Glutamat aufweisen. Die NMDA-Rezeptoren werden durch N-Methyl-D-aspartat (NMDA) aktiviert und als ionotrope Rezeptoren klassifiziert. Das bedeutet, dass es sich bei ihnen um Kationenkanäle handelt, deren Öffnung durch die Bindung von Glutamat verstärkt wird. Eine zweite Familie besteht aus den ebenfalls ionotropen AMPA- und Kainat-Rezeptoren, die ebenfalls nach ihren Agonisten α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionsäure (AMPA) bzw. Kainat benannt wurden. Die dritte Rezeptorfamilie ist die der metabotropen Rezeptoren, die nach der Bindung von Glutamat G-Protein gekoppelt Enzymkaskaden aktivieren (Danbolt, 2001). Glutamatrezeptoren kommen am häufigsten im Kortex und den Basalganglien vor, wobei NMDA- und AMPA-Rezeptoren im Allgemeinen kolokalisiert und wesentlich zahlreicher als die Kainat-Rezeptoren sind.

Da mit Memantin in dieser Arbeit ein nichtkompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist als mögliches Therapeutikum gegen die HIV-Demenz untersucht wurde, soll der Aufbau und die Funktion des NMDA-Rezeptors kurz näher erläutert werden (s. auch Abb. 8). Der wirkungsvollste Agonist der NMDA-Rezeptoren in Gehirn von Säugetieren ist Glutamat, aber auch Aspartat und das synthetische Analogon NMDA besitzen agonistische Wirkung. Gleichzeitig zur Bindung eines Agonisten muss Glycin in seiner eigenen Untereinheit binden, um den Ionenkanal zu öffnen. Man spricht deshalb auch von Koagonisten. Kynurensäure, die endogen von Gliazellen produziert wird, hemmt Glycin und damit indirekt Glutamat in seiner Funktion. Polyamine wie Spermin oder Spermidin docken an eigens für sie vorgesehene Stellen am NMDA-Rezeptor an und haben einen fördernden Einfluss auf die Öffnung des Ionenkanals. Ifenprodil und Eliprodil vermögen diese Polyamine zu hemmen. NMDA-Rezeptoren werden im Normalzustand der Zelle von Mg^{2+} -Ionen blockiert. Diese Blockade löst sich auf, wenn die Zelle depolarisiert wird. Das Anästhetikum Ketamin und das Dissoziativum Phencyclidin sowie Dizocilpin blockieren den NMDA-Rezeptor-gesteuerten Ionenkanal ebenfalls. NMDA-Rezeptoren spielen nicht nur bei der Exzitotoxizität, sondern auch bei der neuronalen Plastizität und der Pathogenese der Epilepsie eine entscheidende Rolle (Siegel et al., 1999).

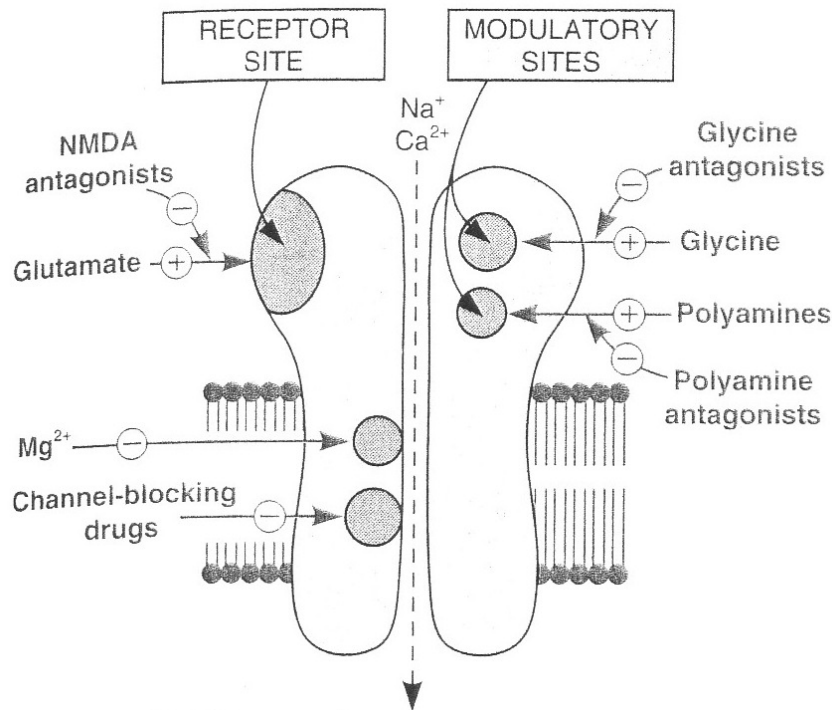


Abb. 8: **NMDA-Rezeptor** (aus Siegel et al., 1999, S. 475).

1.4.2.1.3 Die glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2

Um Überstimulation bzw. Exzitotoxizität zu vermeiden, muss das Glutamat nach seiner Ausschüttung rasch wieder aus dem extrazellulären Raum entfernt werden. Dieser aktive Prozess erfolgt beim Menschen durch fünf hochaffine glutamaterge Transporter: die Excitatory Amino Acid Transporter (EAAT) 1-5.

EAATs werden vorwiegend auf Präsynapsen und Gliazellen exprimiert (Amara & Fontana, 2002). Am häufigsten von allen fünf glutamatergen Transportern konnte EAAT2 im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden, gleich gefolgt von EAAT1. Der größte Teil des EAAT1 und EAAT2 findet sich auf Astrozyten, die den überwiegenden Teil des Glutamats im Rahmen des Glutaminzyklus aufnehmen (Danbolt, 2001). Auch wenn EAAT2 im gesamten Gehirn vorkommt, kann doch eine Häufung dieses Transporters im Hippokampus, lateralen Septum, dem Cortex und Striatum festgestellt werden. Die höchsten Konzentrationen von EAAT3 sind in Hippokampus, den Purkinje-Zellen des Zerebellums und den Basalganglien ermittelt worden (Kugler & Schmitt, 1999). EAAT4 wird ausschließlich auf GABAergen Zelltypen und den zerebellären Purkinje-Zellen exprimiert und scheint sich besonders in der Nachbarschaft exzitatorischer Synapsen zu sammeln, wo die Zellmembranen der Gliazellen die dendritischen Dornen berühren (Tanaka et al., 1997). EAAT5 scheint eine einzigartige Funktion bei der Signalverarbeitung in Photorezeptoren der Retina inne zu haben (Pow & Barnett, 2000).

EAAT2 und EAAT1 nehmen – genau wie die restlichen glutamatergen Transporter – Glutamat entgegen eines Konzentrationsgradienten auf. Die thermodynamisch treibende Kraft hierbei besteht in einem elektrochemischen Natriumgradienten über der Plasmamembran. Der Glutamateinstrom ist an einen Transport von zwei bis drei Natriumionen und einem Proton ins Zellinnere gekoppelt. Gleichzeitig wird ein Kaliumion aus der Zelle hinaus transportiert (Zerangue, 1996). EAAT2 wird durch die Proteinkinase C reguliert und phosphoryliert (Kalandadze et al., 2002).

Der natriumgekoppelte exzitatorische Aminosäuretransporter 2 (EAAT2) ist der wichtigste glutamaterge Transporter im ZNS des Menschen. Zusammen mit EAAT1 hat er den größten Einfluss auf die Wiederaufnahme von Glutamat nach der Neurotransmission (Danbolt, 2002). Da Glutamat neurotoxische Funktion ausüben kann, trägt eine gestörte Funktion oder Regulation von EAAT2 – und in geringerem Maße auch von EAAT1 – zur Entstehung von Exzitotoxizität bei (Diamond & Jahr, 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Mangel an EAAT2 die Anhäufung von extrazellulärem Glutamat fördert und schließlich zu Exzitotoxizität und Zelltod führt. Eine eingeschränkte Funktion des EAAT2 wird mit der Entstehung der amyotrophen Lateralsklerose in Verbindung gebracht (Rothstein et al., 1995).

Auch wenn die postsynaptische Membran in einem gesunden Organismus eine hohe Dichte an hochaffinen EAATs aufweist und durch die Glutamataufnahme von Astrozyten unterstützt wird, kommt es doch zu einem Überlaufen von Glutamat zu benachbarten Synapsen. Dort findet eine Modulation der weiteren glutamatergen, GABAergen und monoaminergen Neurotransmission statt (Hassel & Dingledine, 2006).

1.4.2.1.4 Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität

Glutamat wirkt physiologisch als exzitatorischer Neurotransmitter, kann aber in hohen extrazellulären Konzentrationen auch als Neurotoxin fungieren. Da die neurotoxische Eigenschaft von Glutamat eng mit seiner exzitatorischen Wirkung zusammenhängt, wurde der Begriff Exzitotoxizität geprägt (Olney, 1978).

Unter pathologischen Bedingungen versagen die oben beschriebenen Aufnahmemechanismen von Glutamat in Gliazellen und Nervenendigungen, so dass es durch eine Ansammlung des Transmitters zu einer verstärkten oder verlängerten Aktivierung der ionotropen Glutamatrezeptoren kommt (Doble, 1999). Durch die Depolarisation werden

AMPA-Rezeptoren aktiviert, wodurch sich spannungsgeladene Natriumkanäle öffnen. Durch den folgenden übermäßigen Natriumeinstrom werden nekrotische Veränderungen ausgelöst (Doble, 1999), wobei zunächst die Depolarisation der Zelle aufrechterhalten wird (Kiedrowski et al., 1994). Um das osmotische Gleichgewicht der Zelle wiederherzustellen, kommt es zusammen mit dem Natriumeinstrom zu einem passiven Einstrom von Chloridionen (Rothman, 1985). Der anschließende osmotisch bedingte Einstrom von Wasser lässt die Zelle anschwellen und führt in vielen Fällen zur Lyse der Zellen.

Entscheidender als diese nekrotischen Prozesse ist jedoch der durch die ständige Depolarisation ausgelöste Kalziueinstrom in die Zelle. Die Depolarisation führt zu einer Aufhebung der spannungsabhängigen Magnesiumblockade der NMDA-Rezeptoren, die zusätzlich durch synaptisches Glutamat aktiviert werden. Diese NMDAR-Aktivierung (① in Abb. 9) ist die Hauptursache für den zunehmenden Kalziueinstrom in die Zelle (Zeevalk & Nicklas, 1992). AMPA-Rezeptoren (② in Abb. 9) werden durch das erhöhte extrazelluläre Glutamat ebenfalls angeregt und aktivieren wiederum NMDA-Rezeptoren. Die durch Glutamat auch aktivierten metabotropen Rezeptoren (③ in Abb. 9) bewirken eine erhöhte Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum der Zelle. Die durch die Depolarisation geöffneten spannungsabhängigen Kalziumkanäle (④ in Abb. 9) tragen zur weiteren Glutamatfreisetzung bei. Auch der Natriumeinstrom fördert den Kalziueinstrom, indem er den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch antreibt (⑤ in Abb. 9). Die Depolarisation verhindert die Glutamataufnahme aus dem Extrazellulärraum oder dreht sie sogar ins Gegenteil (⑥ in Abb. 9). Die hauptsächlichsten Mechanismen, die normalerweise gegen einen zu hohen Kalziumanstieg arbeiten, sind die Kalziumpumpe (⑦ in Abb. 9) und indirekt auch die Natriumpumpe (⑧ in Abb. 9). Die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum fungieren in der Zelle als großzügige Kalziumspeicher und halten den Kalziumspiegel normal so unter Kontrolle. Wird jedoch ein bestimmter Kalziumpegel überschritten, stellt das Mitochondrium seine Funktion ein. Der dadurch ausgelöste Mangel an ATP behindert den Abtransport von Kalzium durch die oben erwähnten Natrium- und Kalziumpumpe. Darüber hinaus lässt dieser Mangel an Energie reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Ist eine Zelle an diesem Punkt angelangt, greifen die negativen Rückkopplungsschleifen nicht mehr und die Exzitotoxizität beginnt irreversibel zu werden (Siegel et al., 1999).

Der hohe Kalziumeinstrom löst eine komplexe Kaskade von aktivierten Nukleasen, cytolytischen Proteasen und Kinasen aus, die letztendlich zur Apoptose der Zelle führt. Eine wichtige Konsequenz aus diesem programmierten Zelltod ist die Exozytose von Glutamat aus den Speichervesikeln in die Nervenendigungen.

In der Tat stellt der weitere Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration durch Freisetzung des intrazellulären zytosolischen Glutamats den dritten ausschlaggebenden Faktor der Exzitotoxizität neben den hohen Natrium- und Kalziumeinstrom in die Zelle dar. Diese Freisetzung geschieht – wie oben bereits erwähnt – durch kalziumabhängige Exozytose synaptischer Vesikel, durch Zellyse sowie Verlangsamung oder Umkehrung des Glutamattransports als Folge der chronischen Depolarisation. Das extrazelluläre Glutamat verstärkt nicht nur die schon vorhandene Exzitotoxizität, sondern diffundiert weiter zu gesunden Neuronen, um sie ebenfalls zu depolarisieren. So entsteht ein Teufelskreis, der die Exzitotoxizität weiter ausbreitet und verstärkt (Doble, 1999).

Durch Aktivierung kalziumabhängiger Enzyme wie z.B. Phospholipase A₂ und Stickoxidsynthase (NOS) und durch die Exzitotoxizität mitbedingte mitochondriale Fehlfunktion entstehen freie Radikale (ROS). Diese greifen u.a. Proteine, Lipide, Mitochondrien sowie mitochondriale und chromosomale DNA an, wodurch dieser als oxidativer Stress bezeichnete Vorgang wesentlich zum Sterben der Zelle beiträgt. Der erhöhte Kalziumspiegel erzeugt auch einen Anstieg der Arachidonsäure (AA), die die Entstehung freier Radikale fördert und die Glutamataufnahme weiter verringert (© in Abb. 9) (Lewen et al., 2000). Die Beteiligung der freien Radikale an der Exzitotoxizität zeigt sich darin, dass Radikalfänger, Antioxidantien und Inhibitoren der Stickoxidsynthase dazu in der Lage sind, exzitotoxische Prozesse abzuschwächen (Nakao, 1996).

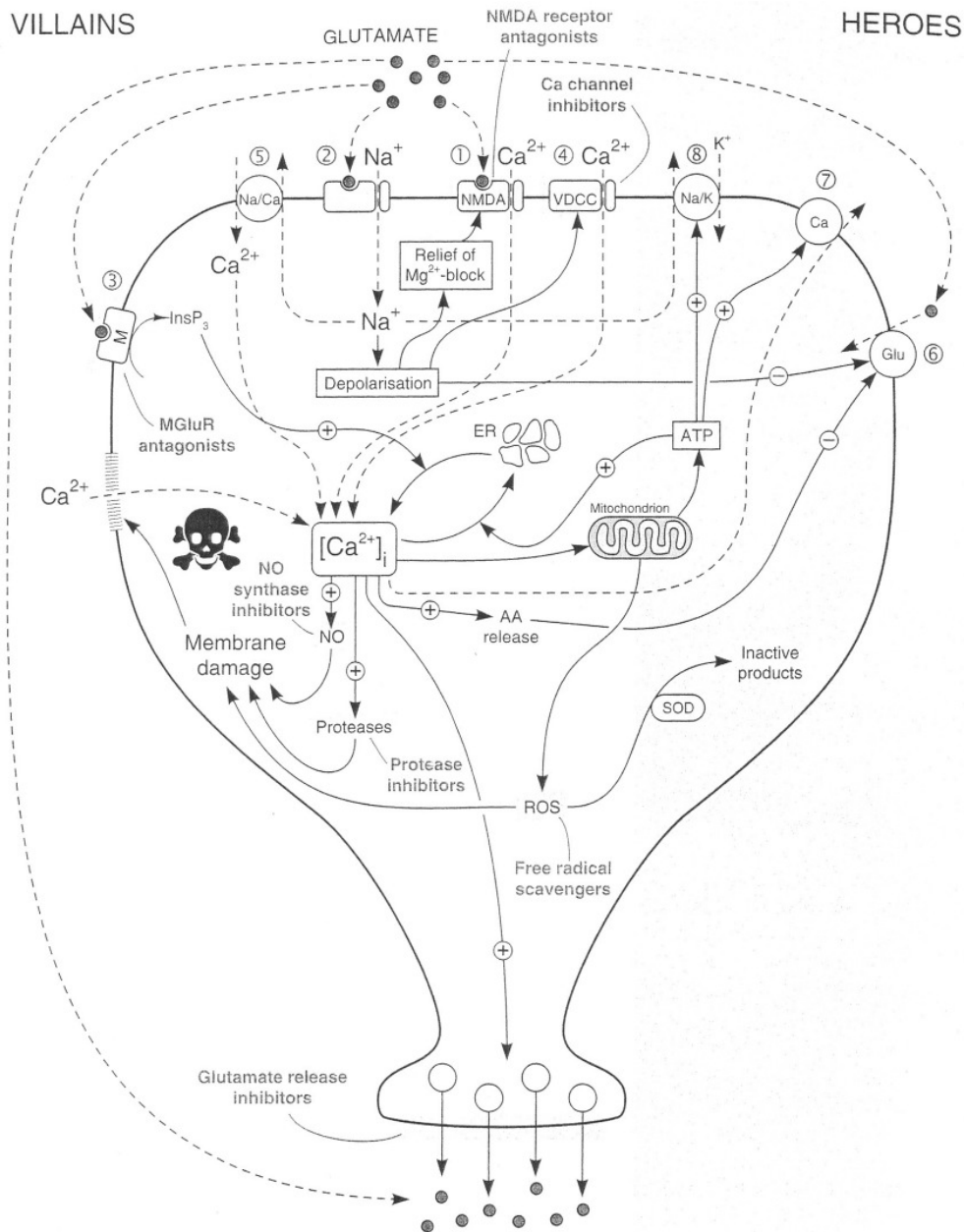


Abb. 9: **Mechanismen der Exzitotoxizität.** Auf der linken Seite schädliche („Villains“), auf der rechten Seite schützende Prozesse („Heroes“). ER = endoplasmatisches Retikulum; AA = Arachidonsäure; ROS = reaktives Sauerstoffradikal; SOD = Superoxiddismutase (aus Siegel et al., 1999, S. 502).

Die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität spielt sowohl bei akuten neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. dem Schlaganfall (Hazell, 2007) eine Rolle, als auch bei chronischen neurodegenerativen Krankheiten wie der amyotrophen Lateralsklerose (Corona et al., 2007), der Parkinson-Krankheit (Beal, 1998), der Chorea Huntington (Fan & Raymond, 2007), der Alzheimer-Krankheit (Hynd et al., 2004), der Multiplen Sklerose (Pitt et al., 2000) und der HIV-Demenz (Kieburz et al., 1991).

1.4.2.2 Das dopaminerge System

Da Dopamin in enger Wechselwirkung mit dem oben beschriebenen Neurotransmitter Glutamat steht und auch die in dieser Arbeit verwendeten Pharmaka zum Teil über die dopaminerge Synapse wirken, soll hier auch kurz auf die dopaminerge Synapse eingegangen werden.

Tyrosin wird mit Hilfe von Sauerstoff und Biopterin durch die Tyrosinhydroxylase in L-Dopa umgewandelt. Das im Zytoplasma gelöste Enzym DOPAdecarboxylase katalysiert mit Pyridoxin als Kofaktor die Umwandlung von L-Dopa in Dopamin. Über einen vesikulären Membrantransporter und mit Unterstützung einer ATP-getriebenen Protonenpumpe wird das Dopamin im Austausch gegen Protonen in das Innere von Speicher-vesikeln transportiert.

Durch den durch ein Aktionspotential ausgelösten Kalziumeinstrom verschmilzt das Vesikel mit der neuronalen Zellmembran und entleert den Transmitter Dopamin in den synaptischen Spalt. Nun erreichen die Dopaminmoleküle durch Diffusion die postsynaptische Membran des Empfängerneurons, in die spezifische Dopaminrezeptoren D₁ bis D₅ eingebaut sind. Die anschließend gebildeten reversiblen Dopamin-Rezeptor-Komplexe lösen intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aus.

Die D₁- und D₂-Rezeptoren kommen am häufigsten in den Basalganglien vor. Im Striatum werden cholinerge Interneurone über D₂-Rezeptoren gehemmt, so dass Dopamin in die Regulation der Motorik eingreift. Im Nucleus Accumbens werden hauptsächlich D₃-Rezeptoren exprimiert.

Um eine Dauerstimulation der Rezeptoren zu vermeiden, wird Dopamin hauptsächlich durch die Wiederaufnahme in die Präsynapse mittels eines Na⁺-kotransportierenden Dopamintransporters aus dem synaptischen Spalt entfernt. Das wieder aufgenommene Dopamin wird entweder erneut in Vesikeln gespeichert oder metabolisiert. Ein kleinerer Teil des Dopamins im synaptischen Spalt wird durch Aufnahme in Gliazellen beseitigt, wo ausschließlich dessen Metabolisierung stattfindet. Für die Metabolisierung sind im Wesentlichen zwei Enzyme verantwortlich: die Monoaminoxidase (MAO) und die Katecholamin-O-Methyltransferase (COMT). Während erstere sowohl in präsynaptischen dopaminergen Neuronen und Gliazellen vorkommt, findet sich die COMT nur in Gliazellen. Deshalb kann in der Präsynapse auch nur die oxidative Desaminierung des Dopamins durch MAO und die folgende Metabolisierung zur 3,4-Dihydroxyphenyl-Essigsäure (DOPAC) stattfinden. Erst durch die COMT in den Gliazellen kann die DOPAC

zur Homovanillinsäure (HVA) methyliert werden. In den Gliazellen besteht zusätzlich die Möglichkeit, Dopamin direkt mit Hilfe der COMT in 3-Methoxytyramin (3-MT) umzuwandeln und diese dann weiter zur HVA abzubauen (Gerlach et al., 2001).

Wie Glutamat kann auch Dopamin als Neurotoxin wirken. Diese Dopamin-vermittelte Neurotoxizität ist allerdings – anders als beim Glutamat – vor allem auf oxidativen Stress zurückzuführen, der durch die Bildung freier Radikale entsteht. Diese Verbindungen reagieren mit Zellbestandteilen wie Mitochondrien und schränken ihre Funktion oft bis hin zum Zelltod ein (Halliwell, 1992). Der Grund für die Entstehung der freien Radikale liegt in der leichten Autoxidation des Dopamins (Stokes et al., 1999).

1.4.2.3 Wechselwirkungen zwischen Glutamat, Dopamin und GABA

Die Grundlage der differenzierten motorischen, affektiven und kognitiven Funktionen der Basalganglien wird in der komplexen Interaktion zwischen Glutamat, Dopamin und dem wichtigsten inhibitorisch wirkenden Transmitter GABA gesehen. Eine Störung dieses empfindlichen Gleichgewichts wurde u.a. beim M. Parkinson, M. Huntington, der Schizophrenie und der HIV-Demenz beobachtet (Mora et al., 2008).

Das Putamen als Teil des dorsalen Striatums und der Nucleus Accumbens des ventralen Striatums (s. unten) ähneln sich in ihrem synaptischen und neurochemischen Aufbau (David et al., 2005). In beiden Gehirnregionen finden sich hauptsächlich mittelgroße dornentragende Neurone. Auf den Köpfen dieser Dornen treffen vor allem exzitatorische glutamaterge Afferenzen ein, während auf den Hälsen der Dornen eher dopaminerge Afferenzen vorkommen. Glutamaterge und dopaminerge Synapsen sind meist gemeinsam an Dornen der GABAergen Projektionsneuronen zu finden. Dieses gleichzeitige Vorkommen und die proximalere Position der dopaminergen Synapse am Dornenhals erlauben die Annahme einer Modulation der glutamatergen Neurotransmission durch Dopamin (Bolam et al., 2000). Für eine enge Vernetzung der beiden Transmittersysteme spricht auch das Vorkommen von Glutamatrezeptoren an dopaminergen Synapsenendigungen und von Dopaminrezeptoren an der glutamatergen Präsynapse. Auf GABAergen Neuronen wurden Rezeptoren sowohl für Glutamat als auch für Dopamin nachgewiesen (Tarazi & Baldessarini, 1999).

Hernandez et al. (2003) zeigten, dass Glutamat und seine Agonisten die Freisetzung von Dopamin und GABA fördern, Glutamatrezeptorantagonisten jedoch das Gegenteil

bewirken. Außerdem fördert Dopamin seinerseits die Sekretion von Glutamat, während Dopaminrezeptorantagonisten diese Freisetzung hemmen (Kalivas & Duffy, 1997).

1.4.2.4 TNF- α als weiteres Neurotoxin

Das Zytokin TNF- α dient neben vielen anderen Funktionen im Immunsystem hauptsächlich der Regulation inflammatorischer Prozesse. Seine Ausschüttung erfolgt vor allem durch aktivierte mononukleäre Phagozyten, zu denen sowohl Makrophagen als auch Mikroglia – die „Makrophagen des ZNS“ – gezählt werden, und reguliert verschiedene Zellen des Immunsystems. Diese aktivierten mononukleären Phagozyten spielen eine große Rolle in neurodegenerativen Prozessen: als wichtigste Immuneffektorzellen im Zentralnervensystem sind sie verantwortlich für Phagozytose, Antigenpräsentation sowie Produktion und Freisetzung verschiedener Effektormoleküle (wie z.B. TNF- α) und neurotoxischer Substanzen (Banati et al., 1993; Gehrman et al., 1995).

Das HI-Virus wird durch Makrophagen ins Gehirn eingeschleust und reichert sich dort in Mikroglia an (Ryzhova et al., 2002). Mikroglia machen ca. 12% aller Zellen im Gehirn aus (Benveniste, 1997), wobei sie zumindest im Mausmodell unter anderem in hoher Dichte in den Basalganglien vorkommen (Lawson et al., 1990). Im physiologischen Zustand ruhen Mikroglia und kontrollieren den Immunstatus des Gehirns (Nimmerjahn et al., 2005). Bei neuronalen Verletzungen werden sie aktiviert und lösen eine sehr schnelle immunologische Reaktion aus (Fetler & Amigorena, 2005). Dann können sie sowohl neuroprotektiv wirken (Streit, 2002), als auch durch Überaktivierung neurotoxische Vorgänge in Gang setzen (Block & Hong, 2005). Dies geschieht durch Ausschüttung zytotoxischer Substanzen wie Superoxid (Colton & Gilbert, 1987), Stickoxide (Liu et al., 2002) und TNF- α (Lee et al., 1993).

Sippy et al. (1995) konnte zeigen, dass sich im Gehirn HIV-infizierter Patienten ein erhöhter Spiegel von TNF- α nachweisen lässt. Zu demselben Ergebnis führten Untersuchungen im Rahmen des SIV/Makakken-Modells (Sopper et al., 1996). Außerdem besteht eine Assoziation zwischen der Überproduktion von Zytokinen und der SIV-Enzephalitis (Orandle et al., 2002). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass mononukleäre Phagozyten die Hauptquelle des TNF- α im ZNS darstellen (Wesselingh et al., 1997) und dass mit Fortschreiten der Infektion das Zytokin in der Transkription

her-aufreguliert wird (Nuovo et al., 1994). Die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität kann durch TNF- α verstärkt werden (Takeuchi et al., 2006).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit geht es hauptsächlich um Veränderungen der glutamatergen Synapse chinesischer und indischer Rhesusaffen in unterschiedlichen Stadien der SIV-Infektion. Die Analysen umfassen die beiden Hirnregionen Putamen und Nucleus Accumbens, da diese als besonders verletzlicher Teil der Basalganglien gelten (Wiley, 1998). Eine Beteiligung glutamaterger Mechanismen an der HIV-Demenz ergab sich aus zahlreichen zuvor durchgeführten Studien: so konnten beispielsweise Xiong et al. (2003) eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch Produkte HIV-infizierter Makrophagen im Xenopus-Expressionssystem nachweisen. Diese Art der Aktivierung verursacht den Zelltod von Neuronen (O'Donnell, 2006). Als indirekte Zeugnisse der glutamatergen Beteiligung an der Entstehung der HIV-Demenz kann u.a. der erhöhte Quinolinsäurespiegel – ein NMDA-Agonist – in der Zerebrospinalflüssigkeit HIV-infizierter Patienten angeführt werden (Heyes et al., 2001). Im Tierversuch konnte direkt im Liquor von Makakken eine durch aktivierte Mikroglia hervorgerufene Erhöhung der Glutamatkonzentration nachgewiesen werden (Koutsilieri et al., 1999). Da in den Basalganglien viele Wechselwirkungen zwischen glutamatergem und dopaminergem System stattfinden (Bolam et al., 2000; Mora et al., 2008), können auch die bereits erwiesenen Beeinträchtigungen des dopaminergen Systems im Putamen und Nucleus Accumbens SIV-infizierter Makakken (Jenuwein, 2004) als Hinweis auf eine Mitbeteiligung der glutamatergen Synapse gedeutet werden.

Um Verschiebungen in der Steuerung des Glutamats aufzudecken, wird die Proteinexpression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 untersucht. Diese hochaffinen natriumabhängigen glutamatergen Transporter sind für die unmittelbare Wiederaufnahme des Glutamats aus dem synaptischen Spalt verantwortlich. Auf diese Weise verhindern sie normalerweise die Entstehung einer durch zu hohe Glutamatkonzentration bedingte Exzitotoxizität (Auger & Attwell, 2000).

Weiterhin wird in der vorliegenden Arbeit die Proteinexpression des zentralen Immunmodulators TNF- α im Nucleus Accumbens und die relative Genexpression von TNF- α im Putamen untersucht, um zum einen Hinweise auf eine mögliche Immunaktivierung im Rahmen der SIV-induzierten Demenz zu erhalten. Zum anderen lassen sich so

Rückschlüsse auf mögliche Effektormechanismen ziehen. Zudem soll die Eignung von TNF- α als möglicher prognostischer Marker bestätigt werden: in anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Immunaktivierung residierender und einwandernder mononukleärer Phagozyten ein besserer Marker für den Infektionsverlauf ist als z.B. die Viruslast (Glass et al., 1995; Bloom & Rausch, 1997).

Neben dem Einfluss der SIV-Infektion auf das glutamaterge System sollen auch mögliche neuroprotektive Pharmaka zur Behandlung oder Vorbeugung der HIV-Demenz im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen. Auch wenn bisherige Therapieversuche der HIV-Demenz mit Selegilin in Tierversuchen (Czub et al., 1999; Czub et al., 2004) wenig erfolgreich waren, so zeigte sich doch in klinischen Studien am Menschen eine Verbesserung der motorischen Beeinträchtigungen durch direkte Gabe von L-Dopa (Mintz et al., 1996). Da Selegilin ebenfalls die Konzentration des Dopamins durch Hemmung seines Abbaus erhöht und eine Wechselwirkung zwischen dopaminergem und glutamatergem System in den Basalganglien nachgewiesen ist (s. 1.4.2.3), soll seine bisher kaum untersuchte Auswirkung auf die beiden glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 sowie auf das potentielle Neurotoxin TNF- α untersucht werden.

Das bereits klinisch als Antidementivum eingesetzte Memantin soll ebenfalls in seiner Wirkung auf das glutamaterge System SIV-infizierter Makakken analysiert werden. Der Effekt dieses nichtkompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf EAAT1 und EAAT2 ist aufgrund seiner direkten Wirkung im glutamatergen System für die vorliegende Arbeit natürlich besonders interessant. Doch auch die Beeinflussung der Expression des Zytokins TNF- α durch Memantin in SIV-infizierten Affen war Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen.

Aufgrund der entscheidenden Mitbeteiligung von oxidativem Stress an der Entstehung der Exzitotoxizität (s. 1.4.2.1.4) war es ein weiteres Ziel dieser Studie, die Wirkungen der Antioxidantien NAC, Melatonin und auch Selegilin auf die Expression der glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 sowie TNF- α zu ermitteln.

Dadurch, dass die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 in vorliegender Arbeit immer jeweils für das Putamen als auch für den Nucleus Accumbens ermittelt wurde, konnten diese beiden Hirnregionen der Basalganglien direkt bzgl. der Auswirkung der Infektion sowie der verschiedenen Therapeutika miteinander verglichen wer-

den. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand also auch darin, das Zusammenspiel beider Hirnregionen in der Regulation der Motorik besser zu verstehen.

Kneitz et al. (2007) konnten in einer biostatistischen Analyse zeigen, dass nur 20 Gene von infizierten chinesischen Rhesusaffen durch das SI-Virus verändert wurden, während die indische Subspezies 237 Gene in ihrer Expression änderte. Keines dieser regulierten Gene war beiden Subspezies gemeinsam. Dies deutet neben vielen anderen Ergebnissen darauf hin, dass es sich bei chinesischen und indischen Rhesusaffen um zwei genetisch unterschiedliche Subspezies handelt, die auch durch genetische Marker voneinander differenziert werden können (Penedo et al., 2005). Diese genetische Unterschiedlichkeit ist möglicherweise die Erklärung für den höheren Prozentsatz an Tieren mit schneller Krankheitsentwicklung („rapid progressors“) unter den indischen Makaken (Marthas et al., 2001; Kneitz et al., 2007).

Fraglich ist, ob sich diese Unterschiede auch in unterschiedlicher Ausprägung der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität bemerkbar machen. Deshalb stellte der Vergleich der chinesischen mit der indischen Makakenspezies hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 sowie ihrer TNF- α -Expression ein weiteres Ziel dieser Arbeit dar.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden werden sowohl die Chemikalien und Geräte aus dem Labor des Instituts für Virologie und Immunologie der Universität Würzburg als auch des Labors der Universitätsklinik Würzburg für Psychiatrie und Psychotherapie aufgeführt.

2.1.1 Chemikalien

- Agarose; NEEO Ultra Qualität (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Art.-Nr.: 2267.3
- Anti-EAAT1 [excitatory amino acid transporter 1 (monoklonales Maus IgG₁)], (Novo Castra, Newcastle upon Tyne, UK), Clone: 10D4
- Anti-EAAT2 [excitatory amino acid transporter 2 (monoklonales Maus IgG_{2a})], (Novo Castra, Newcastle upon Tyne, UK), Clone: 1H8
- Anti-mouse IgG, HRP Conjugate (BIO-RAD, California, USA), Cat.: 172-1011
- Anti-rabbit-IgG (Anti-Kaninchen IgG), HRP-linked Antibody (BIO-RAD, California, USA), Cat.: 172-1019
- Aqua bidest.
- Aqua demin.
 - Biotinylated Protein Ladder Detection Pack (Cell Signaling, Boston, USA), Nr. #7727:
 - Biotinylated Protein Ladder, 10 Banden zwischen 9-200 kDa
 - Anti-Biotin HRP-linked Antibody
- Bovines Serumalbumin (BSA) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Bradfordkonzentrat (BioRad, München, Deutschland)
- DEPC- (Diethylpyrocarbonat-) Wasser
- ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Rockford, USA), Art.-Nr.: 32106
- ECL Super Signal West Pica Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, USA), Art.-Nr.: 34080
- Ethidiumbromid
- Fluorescein: Calibration Dye, 1mM in DMSO (BIO-RAD, California, USA), Cat.: 170-8780
- Fötale Kälberserum (FCS) (Linearis)
- GenElute Gel Extraction Kit (Sigma, St. Louis, USA), NA 1111-1KT:
 - Column Preparation Solution, C2112 – 60 ml, 036K6119
 - Elution Solution, E 9027 – 6 ml, 026K6025

- Gel Solubilization Solution, G8668 – 140 ml, 026K6027
 - Wash Solution Concentrate G, W2139 – 12 ml, 016K6165
- Magermilchpulver (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), Best.-Nr.: CM35
- Mass Ruler Loading Dye Solution 6fach (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), Cat.: R0621
- Mass Ruler Low Range Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), Cat.: SM 0383
- Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Art.-Nr.: 8388.6
- Natronlauge (Merck, Darmstadt, Deutschland), Cat.: 1.05588
- Orange Loading Dye Solution 6fach (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), #R0631
- O'Range Ruler – 50 bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), #SM0613
- Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), #SM1811
- PBS-Lösung (phosphate buffered saline)
- peqGOLD PCR Master Mix S (peqLab)
- Ponceau S Solution (Sigma, St. Louis, USA), Art.-Nr.: P7170-1L
- QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), Cat.: 204143:
 - RNase free water, Mat.-No.: 1012888
 - QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, Mat.-No.: 1017340
- Rosswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) (Gibco)
- Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland), Cat.: 1.09911
- TAE-Lösung (Tris-(Hydroxymethylaminomethan)-Azetat-EDTA)
- Taq 2fach Mastermix (New England BioLabs, Ipswich, USA), Art.-Nr.: M0270L
- TNF- α -Primer-forward #77: atggcagagaggaggtgacc
- TNF- α -Primer-reverse #78: tactcccaggtcctcttca
- Tris/Glycin SDS Running Buffer (Novex/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Tris/Glycin Transfer Buffer (selbst hergestellt)
- Tris/Glycine SDS Sample Buffer (Probenpuffer) (Novex/Invitrogen, Carlsbad, USA), Cat.: LC2676
- Tween 20 (Appllichem, Darmstadt, Deutschland), Nr.: A1389 (0500)
- VE-Wasser (vollentsalzt)

2.1.2 Geräte und Sonstiges

- Abzug: Gelaire Flow Laboratories BSB4A Serial Nr.: 50438 (Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Deutschland), Inv.-Nr.: II/22,2
- Agarosegel-Gießkammer (institutseigene Werkstatt)
- Agarosegel-Laufkammer (institutseigene Werkstatt)
- Blottingpapier (0,37mm, 190 g/cm²) (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
- Blottingpapier (1,4mm, 550 g/cm²) (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
- Chemische Waage Mettler HL 52 (Mettler, Geissen, Schweiz), Messgenauigkeit ± 0,01 mg
- Chemische Waage Scaltec Instruments SBA 51 (Heiligenstadt, Deutschland), Messgenauigkeit ± 0,01g
- Cycler IQ Optical tape (BIO-RAD, California, USA), Cat.: 2239444
- ELISA-Reader (Tecan)
- Eppendorfgefäß 1,5 ml (SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland), Ref.-Nr.: 72690
- Gefrierschrank (Bosch – Economic)
- Gel Loading Tips (Gelbeladespitzen) 1-200 µl (Hartenstein, Würzburg, Deutschland), Best.-Nr.: G521
- GenElute Gel Extraction Kit (Sigma, St. Louis, USA), NA 1111-1KT
 - Gen Elute Binding Column G, C6863-70EA
 - Microcentrifuge collection tube 2 ml, T7813-70EA
- Glaspipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, Silberbrand Eterna (Brand, Wertheim, Deutschland)
- ICycler IQ, Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad, California, USA), Inventar Nr. LT I/109
- Intelligent dark box, FUJI Film Luminescent Image Analysator LAS-3000
- Klebefolie “Adhesive Seal” (BioRad, California, USA)
- Kühlschrank (Bosch)
- Labor-Timer: Oregon Scientific (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
- Magnetrotor: IKAMAG RO motor (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Deutschland)
- Mikrowelle: brother Powerwave, Inv.-Nr.: LT II/138
- Multifuge 1S-R (Heraeus Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland), Fabr.-Nr.: 40411832

- Netzgerät: Computer Controlled Electrophoresis Power Supply Modell 3000 XI (BIO-RAD, California, USA)
- Nitrocellulose Membran (Hybond ECL) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), Code: RPN3032D
- PCR Mikrotiterplatte 96 wells, SAMPLE PACK Thermo-Fast 96 semi-skirted (Abgene House, Surrey, UK), Cat.: AB-0900
- PCR Reaktionsgefäß 0,2 ml (Biorad, München, Deutschland)
- PCR Stromquelle LKB Bromma 23C1, Macrodrive 1 Power Supply, Inv.-Nr.: LE II/41
- PCR-UV-Kammer, INTAS Gel Imager, Inv.-Nr.a. PG II/44
- Pipetten, 0,2-2 µl, 2-20 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl (GILSON, Middleton, USA)
- Pipettenspitzen:
 - gelb, 5-200 µl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Kontroll-Nr.: 70024032
 - blau, 100-1000 µl (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
 - weiß, 0,5-10 µl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Kontroll-Nr.: 50021103
- Pipettierhilfe Pipetboy Comfort, IBS Integra Biosciences, 9V AC
- Plastikpipetten, steril 5 ml, Cellstar Serological Pipette (greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- PP (Polystyrene and Polypropylene)-Test tubes, 15 ml steril cellstar (greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland), Cat.: 188 271
- PP (Polystyrene and Polypropylene)-Test tubes, 50 ml steril cellstar (greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland), Cat.: 227 261
- Real-Time Thermocycler (Biorad, iCycler iQ)
- Spektrophotometer (Perkin – Elmer, Überlingen, Deutschland)
- Stainless steel beads 5 mm (QUIAGEN, Hilden, Deutschland), Cat.: 69989.
- Thermocycler (Biorad, MyCycler)
- Thermoheizblock, TDD-120 Dry Block Heating Thermostat, Prod.-Nr.: 009036
- Tris-Glycine Gels 10%, 1 mm Dicke, 15 Taschen (Novex/Invitrogen, Carlsbad, USA), Cat.: EC60755BOX
- UV-Küvette, 50-2000 µl (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Vortex: Genie 2 (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)

- Wasserbad
- Western Blot Blottingkammern:
 - Semidry electroblotter (JANCOS, Dänemark)
 - Perfect Blue Tank-Elektroblotter (PEQLAB, Erlangen, Deutschland)
- Western Blot Laufkammern, Novex-X-Cell (Novex/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Tischzentrifuge Biofuge pico (Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland)
- Tissue-Lyser (QUIAGEN, Hilden, Deutschland), Cat.: 85300.
- Zentrifuge Hettich Rotixa/RP (Heinse + Ziller, Würzburg, Deutschland), Inv.-Nr. LZ II/81

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Rhesusaffen (Makakken; *Macaca mulatta*) im Alter von durchschnittlich $3,7 \pm 0,6$ Jahre.

2.2.1.1 Haltung

Die Tiere wurden in Einzelkäfigen im Deutschen Primaten Zentrum in Göttingen bei einem circadianen Rhythmus mit 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit gehalten. Sie bekamen zwei Mal täglich Trockenfutter mit frischen Früchten, Wasser stand ihnen ständig zur Verfügung.

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 Aufteilung der Affen erfolgte in folgende Versuchsgruppen (s. auch 2.2.1.6): die Kontrollgruppe bestand aus gesunden und unbehandelten Tieren sowohl chinesischer als auch indischer Herkunft. Um die Auswirkungen des natürlichen Verlaufs der Krankheit abschätzen zu können, wurde eine Gruppe aus mit SIV infizierten und unbehandelten Rhesusaffen gebildet, die sich wieder aus chinesischen und indischen Tieren

zusammensetzte. Die „AIDS“-Gruppe schloss ebenfalls Affen beider Herkunftsländer ein, die unbehandelt im Endstadium der Krankheit getötet wurden.

Die folgenden Behandlungsgruppen wurden nur aus infizierten chinesischen Tieren gebildet, von denen ein Teil mit Selegilin, ein anderer mit Memantin, ein dritter mit Selegilin und Memantin, ein vierter mit NAC und Melatonin und schließlich ein letzter mit NAC, Melatonin und Selegilin behandelt wurde. Außerdem existierte zu Vergleichszwecken eine Gruppe aus uninfizierten mit Selegilin behandelten Tieren.

2.2.1.3 Infektion

Die Rhesusaffen aus China wurden unter Ketaminnarkose (10 mg/kg) mit dem Virus SIVmac251MPBMC, einem Virenstamm mit hauptsächlich makrophagotroper Wirkung, infiziert. Zwei indischen Tieren der „AIDS“-Gruppe und fünf indischen Makakken der Gruppe der Infizierten wurde ebenfalls der Virus SIVmac251MPBMC injiziert. Zwei indischen Rhesusaffen der „Infizierten“-Gruppe und vier indischen Affen der „AIDS“-Gruppe wurde hingegen der lymphotrope Virustyp SIVmac239 injiziert.

Zwei Wochen nach der Infektion war die maximale Virämie erreicht. Den Affen der SIV-infizierten und mit Selegilin behandelten Gruppe wurde von diesem Zeitpunkt an einmal täglich bis zu ihrer Tötung Selegilin (2 mg/kg) i.m. injiziert. Die uninfizierten Tiere der Selegilingruppe wurden mit der gleichen Dosis Selegilin behandelt. Die nur mit Memantin behandelten Affen bekamen 10 mg Memantin pro kg Körpergewicht p.o. täglich. Die Gruppe mit der kombinierten Gabe aus Selegilin und Memantin wurde täglich 2 mg Selegilin pro kg Körpergewicht i.m. injiziert und 10 mg Memantin pro kg Körpergewicht p.o. gegeben. In der Gruppe mit der NAC und Melatonin-Behandlung gab es jeden Tag 20 mg pro kg Körpergewicht NAC i.m. sowie 1 mg pro kg Körpergewicht Melatonin p.o.. Für die Gruppe mit der Behandlung aus NAC, Melatonin und Selegilin wurde einmal täglich NAC (20 mg/kg/KG i. m.), Melatonin (1 mg/kg/KG p.o.) und Selegilin (2 mg/kg/KG i. m.) verabreicht.

2.2.1.4 Tötung

Unbehandelte Tiere wurden zusammen mit behandelten Tieren jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der SIV-Infektion getötet. Die Tiere starben unter Anästhesie durch Ausbluten. Ihre Gehirne wurden mit jeweils 2 Litern RPMI 1640 Medium mit

3% FCS [v/v] perfundiert und anschließend schnell entnommen. Ein Teil wurde für lichtmikroskopische Untersuchungen mit 5% Formaldehyd fixiert, während der Rest für biochemische Analysen in größere Teilstücke geschnitten und bis zur weiteren Sektion bei -70°C tief gefroren wurde.

2.2.1.5 Sektion

Da das Gewebe bei -70°C zu hart zum Schneiden ist, erfolgte die weitere Sektion auf einer auf -20°C gekühlten Teflonplatte. Mit einem Skalpell wurden aus den entsprechenden Hirnteile Putamen und Nucleus Accumbens frei präpariert und mit Hilfe eines stereotaktischen Atlanten klassifiziert. Im Anschluss wurde die weiße Substanz entfernt und die erhaltenen Gewebeproben bis zur neurochemischen Analyse bei -70°C gelagert.

2.2.1.6 Tabelle der verwendeten Versuchstiere

Unten stehend findet sich eine Übersicht aller für die Analyse der relativen Proteinexpression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 (s. 3.3) wie auch der relativen Gen- und Proteinexpression des TNF- α (s. 3.4) verwendeten Makaken. Insgesamt lassen sie sich in 11 Gruppen einteilen (s. auch 2.2.1.2). Das Versuchstier Nr. 9831 mit der Apomorphin-Behandlung diente als Standard.

Tab. 1: Liste aller verwendeten Versuchstiere. Wpi: weeks per infection, also Infektionsdauer in Wochen. Mock steht für eine Injektionsbehandlung, die statt der Medikation nur physiologische Kochsalzlösung enthielt; rapid bedeutet, dass sich bei diesen Tieren die ersten Krankheitssymptome besonders schnell entwickelten. Entsprechend handelt es sich bei rapid AIDS-Tieren um Affen mit besonders schnellem Ausbruch von AIDS. Sel+Mem: Selegilin+Memantin; Mem: Memantin; NAC+Mel: N-Acetylcystein+Melatonin; NAC+Mel+Sel: N-Acetylcystein+Melatonin+Selegilin.

Nr.	Land	Virustyp	wpi	Infektionsverlauf	Behandlung
9332	China	-	0	uninfiziert	keine
9341	China	-	0	uninfiziert	keine
9329	China	-	0	uninfiziert	keine
8993	China	-	0	uninfiziert	Mock
9824	China	-	0	uninfiziert	Mock
9825	China	-	0	uninfiziert	Mock
1943	Indien	-	0	uninfiziert	keine
7990	Indien	-	0	uninfiziert	keine
8162	Indien	-	0	uninfiziert	keine
8161	Indien	-	0	uninfiziert	keine
8788	Indien	-	0	uninfiziert	keine
8881	China	251 MPBMC	19,1	asymptomatisch	keine
8991	China	251 MPBMC	8	asymptomatisch	keine
8994	China	251 MPBMC	16,3	asymptomatisch	keine
9829	China	251 MPBMC	15,9	asymptomatisch	Mock

9828	China	251 MPBMC	11,9	asymptomatisch	Mock
8179	China	251 MPBMC	12,3	asymptomatisch	keine
8181	China	251 MPBMC	15,1	asymptomatisch	keine
8183	China	251 MPBMC	20,1	asymptomatisch	keine
9541	Indien	251 MPBMC	8,3	rapid	keine
9544	Indien	251 MPBMC	6,3	rapid	keine
8779	Indien	239 334P@L	73,6	asymptomatisch	keine
8649	Indien	239	66	asymptomatisch	keine
8484	Indien	251 MPBMC	16,3	asymptomatisch	keine
8159	Indien	251 MPBMC	18	asymptomatisch	keine
8160	Indien	251 MPBMC	24,1	asymptomatisch	keine
1863	Indien	239	19,1	rapid AIDS	keine
1962	Indien	239	14,1	rapid AIDS	keine
8657	Indien	239	66	AIDS	keine
9034	Indien	239	28,4	AIDS	keine
8665	Indien	251 MPBMC	28,9	AIDS	keine
8482	Indien	251 MPBMC	67,4	AIDS	keine
9340	China	251 MPBMC	31,9	AIDS	Mock
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
9826	China	251 MPBMC	11,9	asymptomatisch	Selegilin
9827	China	251 MPBMC	15,9	asymptomatisch	Selegilin
9830	China	251 MPBMC	32,4	asymptomatisch	Selegilin
9832	China	251 MPBMC	32,4	asymptomatisch	Selegilin
9335	China	251 MPBMC	33	asymptomatisch	Selegilin
8989	China	251 MPBMC	16,3	asymptomatisch	Selegilin
8502	China	251 MPBMC	12,0	asymptomatisch	Selegilin
8178	China	251 MPBMC	15,1	asymptomatisch	Selegilin
8180	China	251 MPBMC	20,1	asymptomatisch	Selegilin
8182	China	251 MPBMC	12,3	asymptomatisch	Selegilin
11588	China	251 MPBMC	13,0	asymptomatisch	Sel+Mem
11589	China	251 MPBMC	14,0	asymptomatisch	Sel+Mem
10635	China	251 MPBMC	13,0	asymptomatisch	Sel+Mem
10642	China	251 MPBMC	14,0	asymptomatisch	Sel+Mem
10644	China	251 MPBMC	12,0	asymptomatisch	Mem
11586	China	251 MPBMC	14,0	asymptomatisch	Mem
11587	China	251 MPBMC	13,0	asymptomatisch	Mem
10636	China	251 MPBMC	14,0	asymptomatisch	Mem
10637	China	251 MPBMC	11,0	asymptomatisch	NAC+Mel
10638	China	251 MPBMC	14,0	asymptomatisch	NAC+Mel
10639	China	251 MPBMC	16,0	asymptomatisch	NAC+Mel
10640	China	251 MPBMC	16,0	asymptomatisch	NAC+Mel+Sel
10641	China	251 MPBMC	14,0	asymptomatisch	NAC+Mel+Sel
10643	China	251 MPBMC	11,0	asymptomatisch	NAC+Mel+Sel
9831	China	251 MPBMC	15,0	asymptomatisch	Apomorphin

2.2.2 Archivierung

Die einzelnen Gewebeproben der verschiedenen Gehirnregionen der Rhesusaffen wurden jeweils in einem Eppendorfgefäß in Kryoboxen im Gefrierschrank bei -70°C aufbewahrt.

2.2.3 Probengewinnung und Bestimmung ihres Gesamtproteingehalts

Von der tiefgefrorenen Probe des Hirngewebes Nucleus Accumbens oder Putamen wurde mit einem Skalpell ein Stück von ca. 25-60 mg abgetrennt und nach dem Wiegen in ein Eppendorfgefäß überführt. Von der Probe 9831 des Nucleus Accumbens, die als interner Standard dienen sollte, wurde eine Menge von etwa 200 mg abgewogen. Anschließend wurde das Restgewebe der ursprünglichen Proben wieder bei -70°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Es ist darauf zu achten, dass die Proben während der gesamten Aufarbeitung nie vollständig auftauen, da sonst die Proteinstrukturen zerstört werden würden.

2.2.3.1 Subzelluläre Fraktionierung nach Jarabek

Die abgewogenen Gewebestücke wurden mit ca. 1 ml TEVP-Puffer vermischt und für 5 Minuten auf Eis aufgetaut.

TEVP-Puffer	
Tris-HCl	10 mM
NaF	5 mM
Na_3VO_4	1 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
pH 7,4	

Zu den Gewebeproben wurde anschließend jeweils ein 5 mm großes Stahlkugelchen (stainless steel beads) gegeben, die Gefäße gut verschlossen und dann ca. 2 Minuten mit dem Tissue-Lyser mit 20 Hz homogenisiert.

50 μl dieses Gesamthomogenats wurden aufgehoben. Der Rest des Homogenats wurde in 5 ml-Sarstedt-Zentrifugenröhrchen mit 32 600 g ($g = 9,82 \text{ m/s}^2$) für 16 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand konnte dann in ein Eppendorfgefäß überführt werden und als Cytosolfraktion aufgehoben werden. Das Pellet am Boden der Zentrifugenröhrchen wurde mit 250 μl TEVP resuspendiert und so die Membranfraktion hergestellt (Jarabek et al., 2004).

2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip des Bradfordassays (Bradford, 1976) beruht darauf, dass sich in der Probe enthaltenes Protein an den Farbstoff Coomassie brilliant blue G-250 des Bradfordkonzentrats bindet. Durch diese Komplexbildung erfolgt eine Stabilisierung dieses Farbstoffs in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform. Im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum von $\lambda=465$ nm (ohne Protein) nach $\lambda=595$ nm (mit Protein). Die photometrisch sehr genau bestimmbare Zunahme der Absorption bei 595 nm entspricht dem Proteingehalt der Lösung.

Zunächst wurde die benötigte Menge an Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:4 mit dest. Wasser verdünnt. Nun wurde eine Standardreihe mit 10 Verdünnungsstufen angelegt: jeweils 1 ml Bradford-Reagenz wurde in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und 0 bis 30 μ l Proteinstandard (1 μ g/ μ l bovines Serumalbumin (BSA)) in 3er Schritten – was 0 bis 30 μ g Protein entsprach – hinzu pipettiert.

Von den zu bestimmenden Proben wurden zwischen 1 und 10 μ l eingesetzt, bis die Blaufärbung des Bradfordkonzentrats in etwa der Mitte des BSA-Standards lag. Der Proben-Nullwert setzte sich aus 1 ml Bradford-Reagenz mit 1-10 μ l Probenpuffer zusammen. Danach wurden alle Ansätze gevortext und für mind. 5 Minuten bei RT inkubiert. Es wurden jeweils 200 μ l der Standardreihe, des Nullwerts und der Proben in eine 96-Loch-ELISA-Platte pipettiert. Alle Ansätze wurden 3fach bestimmt.

Tab. 2: Pipettierschema der Proben für eine Proteinbestimmung nach Bradford auf einer 96-Loch-Platte (je 200 μ l/Vertiefung):

0	0	0	24	24	24	X ₆	X ₆	X ₆	X ₁₄	X ₁₄	X ₁₄
3	3	3	27	27	27	X ₇	X ₇	X ₇	X ₁₅	X ₁₅	X ₁₅
6	6	6	30	30	30	X ₈	X ₈	X ₈	X ₁₆	X ₁₆	X ₁₆
9	9	9	X ₁	X ₁	X ₁	X ₉	X ₉	X ₉	X ₁₇	X ₁₇	X ₁₇
12	12	12	X ₂	X ₂	X ₂	X ₁₀	X ₁₀	X ₁₀	X ₁₈	X ₁₈	X ₁₈
15	15	15	X ₃	X ₃	X ₃	X ₁₁	X ₁₁	X ₁₁	X ₁₉	X ₁₉	X ₁₉
18	18	18	X ₄	X ₄	X ₄	X ₁₂	X ₁₂	X ₁₂	X ₂₀	X ₂₀	X ₂₀
21	21	21	X ₅	X ₅	X ₅	X ₁₃	X ₁₃	X ₁₃	X ₂₁	X ₂₁	X ₂₁

Standardreihe: Rinder -Serum –Albumin BSA

X₁: Proben-Nullwert (=Bradford –Reagenz mit 1-10 μ l PBS)

X_{n>1}: unbekannte Proben

Die Platte wurde anschließend in den ELISA-Reader gestellt und die Extinktion der Proben bei 595 nm gemessen. Durch den Vergleich der gemessenen OD₅₉₅-Werte der Proben mit denen der Standardreihe wird auf die Proteinkonzentration der Proben geschlossen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Excel: es wurde eine Eichgerade erstellt und die Geradengleichung anhand des Quotienten aus Mittelwert der Extinktion y und Steigung m der Geraden erstellt ($x=y/m$). Das Ergebnis x stellt die Proteinkonzentration dar und wurde durch die eingesetzte Probenmenge geteilt, um die Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu erhalten.

Um die vorgesehenen Experimente zu vereinfachen, wurden die Proben der Totalhomogenate und der Membranfraktion so mit Probenpuffer verdünnt, dass sich eine Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ergab, für die Cytosolfraktion wurde eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hergestellt. Die Membranfraktion fand in der weitergehenden spezifischen Proteinbestimmung der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 mittels Western Blots (s. 2.2.4.1) Verwendung. Die Cytosolfraktion bildete die Grundlage der spezifischen Proteinbestimmung des TNF- α durch das ELISA-Verfahren (s. 2.2.5.4).

2.2.4 Bestimmung von EAAT1 und EAAT2

Die Analyse des Gehalts an exzitatorischen Aminosäuretransportern 1 und 2 (EAAT1 und EAAT2) im Nucleus Accumbens und Putamen erfolgte mittels Proteinbestimmung durch Western Blots. Voraussetzung hierfür war die Bestimmung des Gesamtprotein-gehalts des Gehirngewebes durch Bradford Assay, der aber auch die Proteinbestimmung des TNF- α mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ermöglichte.

2.2.4.1 Prinzip des spezifischen Proteinnachweises mittels Western Blot-Verfahren

Das Verfahren des Western Blots ermöglicht es, sehr selektiv bestimmte Proteine in einem Proteingemisch zu identifizieren und die Menge eines in der Probe vorhandenen Proteins semiquantitativ zu analysieren.

2.2.4.1.1 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor dem eigentlichen „Blotten“ wird eine Gelelektrophorese, die sog. SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese) nach Lämmli et al. (1970) durchgeführt, bei der die zu untersuchenden Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht in einzelne Proteinbanden aufgetrennt werden. Dazu wird zunächst das Proteingemisch mit einem Überschuss SDS versetzt und bei 95°C hitzedenaturiert. Eine wei-

tere Denaturierung bewirkt die im Probenpuffer enthaltene reduzierende Thiolverbindung Dithiothreitol (DTT) durch Spaltung von Disulfidbrücken. Das anionische SDS bindet an die Proteine, wodurch dessen Eigenladung vernachlässigbar und das Verhältnis von Ladung zu Größe für jedes Protein annähernd gleich wird, d.h. die Proteine werden proportional zu ihrer Größe negativ geladen. Somit ist die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Proteine zur Anode im elektrischen Feld ausschließlich von deren Molekulargewicht und der Porengröße des Gels abhängig. Durch den Vergleich mit einem Protein-Standard, der nur Proteine bekannter molekularer Masse enthält, lässt sich so die molekulare Masse unbekannter Proteine bestimmen.

2.2.4.1.2 *Western Blot*

Nun erfolgt der eigentliche Western Blot, nämlich die elektrische Übertragung („Blotting“) der im Gel aufgetrennten Proteinbanden auf eine Protein bindende Membran wie z.B. in der vorliegenden Arbeit eine Nitrozellulosemembran.

Das die Proteinbanden enthaltende Gel wird in einer speziellen Kammer (Blottingkammer) möglichst ohne Lufteinschlüsse auf die Membran gelegt. Ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel stehendes elektrisches Feld wird angelegt, wodurch die Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern und dort an den Nitrogruppen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Die nun exponiert auf der Membran liegenden Proteine sind so einer Anfärbung durch Antikörper (indirekte Immunfärbung) zugänglich.

Der eben beschriebene elektrophoretische Transfer kann mittels zweier verschiedener Verfahren bewerkstelligt werden: dem sog. Wet- oder Tank-Blot sowie dem semi-dry-Verfahren (s. Abb. 10).

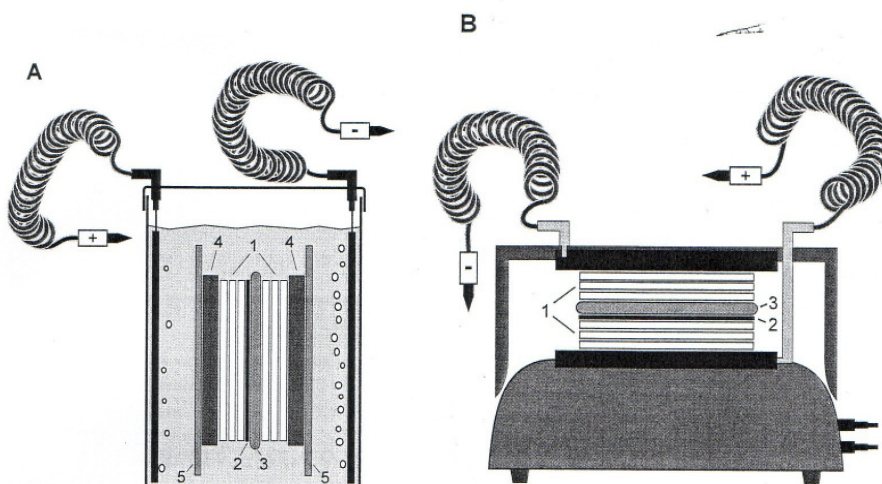


Abb. 10.: Aufbau eines Elektrobloths: A: Wet-(Tank)-Blot. B Semi-dry Blot. 1: Filterpapiere; 2: Membran; 3: Gel; 4: Schwammtuch; 5: Kunststoffgitter. Aus Gassen und Schimpf (2002), S. 203.

Der Vorteil des Tank-Blots besteht darin, dass der Transfer sehr schonend ist, da das geblottete Protein aufgrund des großen Puffervolumens nur wenig erwärmt wird. Dies ist der Grund, warum in der vorliegenden Arbeit das Gewebe des Putamens, das sich in Vorversuchen stets schlechter auf die Nitrozellulosemembran übertragen ließ als das des Nucleus Accumbens, mit dem Tank-Blot-Verfahren transferiert wurde. Als nachteilig müssen die hohen Anschaffungskosten einer Tank-Blot-Kammer und der etwas höhere zeitliche und arbeitstechnische Aufwand bei der Durchführung des Blottens gesehen werden. Das in der vorliegenden Arbeit für die Proben des Nucleus Accumbens angewandte semi-dry-Verfahren benötigt hingegen nur wenig Transferpuffer und erlaubt einen schnelleren Transfer. Aufgrund der größeren Hitzeentwicklung kommt es mitunter jedoch zu einer unvollständigen Übertragung der Proteine oder sogar zu Verfärbungen der Membran.

Mit beiden Verfahren lassen sich mehrere (im vorliegenden Fall bis zu vier) Gele gleichzeitig transferieren.

2.2.4.1.3 Immunfärbung der Nitrozellulosemembran

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose müssen die unspezifischen freien Bindungsstellen der Membran durch eine Blockierlösung, wie z.B. Milchlösung, abgesättigt werden, um eine Bindung des spezifischen Antikörpers an diese Stellen zu verhindern. Im Anschluss wird das nachzuweisende Protein mit Hilfe des spezifischen primären Antikörpers markiert. An diesen Antigen-Antikörper-Komplex bindet nun der sekundäre Antikörper, der spezifisch gegen bestimmte Bereiche des primären Antikörpers gerichtet ist. Dieser zweite Antikörper ist an ein Enzym, im vorliegenden Fall Horseradish Peroxidase (HRP), gekoppelt, das wiederum mit einem Nachweisreagenz (wie z.B. ECL) ein photoemittierendes Produkt bildet. So wird die Position des Antigen-Antikörper-Komplexes detektiert und kann nun mittels Röntgenfilm oder mit Hilfe einer speziellen Kamera („DarkBox“) sichtbar gemacht werden. Aufgrund der unterschiedlichen Grauwerte der spezifischen Proteinbanden ist mit der entsprechenden Software eine semiquantitative Analyse der in den Proben enthaltenen Proteinmenge möglich (Laemmli, U. K., 1970; Burnette, W. N., 1981 und Gassen & Schrimpf, 2002). Auf diese Weise wurde in der vorliegenden Arbeit die EAAT1- und EAAT2-Konzentration im Hirngewebe von Rhesusaffen bestimmt.

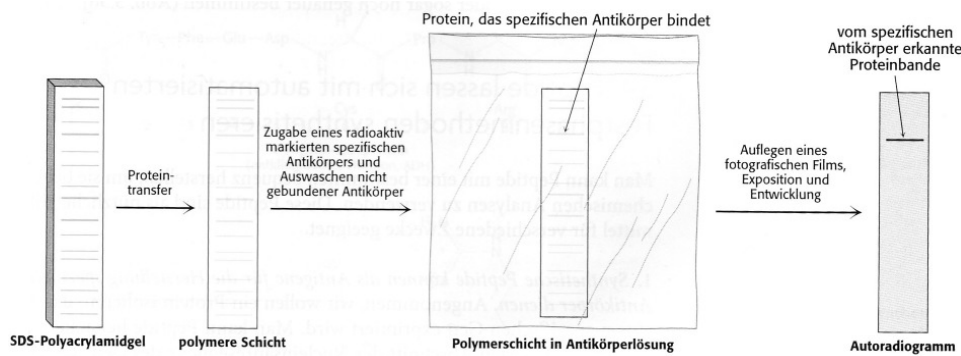


Abb. 11: Western Blotting: Die in einem SDS-Polyacrylamidgel getrennten Proteine werden auf eine polymere Schicht (z.B. Nitrocellulose) übertragen und mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert. Auf dem Autoradiogramm bzw. dem in der Darbox entwickelten Bild zeigt sich die Bande, die dem gesuchten Protein entspricht. Aus Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2007), S. 97.

2.2.4.2 Protokoll des Vorgehens beim Western Blot

Bei den verwendeten Gewebeproben handelte es sich um die Membranfraktion der jeweiligen Region (N.Accumbens oder Putamen) des Affengehirns.

2.2.4.2.1 SDS-Gelelektrophorese

Die gepufferten Proben waren zur Aufbewahrung im Gefrierschrank bei -18°C in Eppendorfgläsern tief gefroren und mit Angaben zur Konzentration, dem jeweiligen Gewebe (Nucleus Accumbens oder Putamen) und der Nummer des Versuchstiers beschriftet. Vor jedem Versuch wurden die jeweils benötigten Proben bei Raumtemperatur langsam aufgetaut.

Währenddessen wurde die Gellaufkammer (Novex/Invitrogen) aufgebaut und zwei 10%ige Polyacrylamidgele (Novex/Invitrogen) von ihrer Kunststoffhülle befreit. Das zum Schutz vor Austrocknung enthaltene flüssige Polyacrylamid wurde ins Spülbecken entleert und der zwischen den Geltaschen steckende Kamm vorsichtig und gleichmäßig von beiden Seiten entfernt, um die zarten Taschen nicht zu beschädigen. Auch der weiße Klebestreifen am unteren Rand des Gels wurde abgezogen und das Gel unter gründlichem Spülen mit (voll)entsalztem Wasser von den Resten des karzinogenen flüssigen Polyacrylamids gesäubert. Die beiden mit der jeweiligen Versuchsnummer beschrifteten Gele wurden mit der niedrigeren Seite nach innen und der Beschriftung nach außen in die Laufkammer gestellt. So konnte das Gel mit dem im Anschluss ins Innere der Kammer gefüllten Laufpuffer (SDS Running Buffer, Novex), der vor der Anwendung 10fach verdünnt werden musste, in Kontakt kommen. Danach wurde auch die äußere Kammer bis ca. 2 cm mit Puffer aufgefüllt, so dass die drei unteren Stege des Gels bedeckt waren. Insgesamt wurde ca. 250 ml Laufpuffer verwendet.

Die mittlerweile bei RT aufgetauten Proben wurden im Heizblock fünf Minuten bei 96°C aufgeköcht und anschließend kurz zentrifugiert sowie vorsichtig gevortext. Mit dem biotinylierten Proteingelmarker (Biotinylated Protein Ladder, Cell Signaling) wurde genauso verfahren, außer dass die Aufkochzeit nur zwei Minuten betrug. Er bietet 10 standardisierte Proteinbanden zur Bestimmung der Proteingröße der analysierten Proben. Die zweite Proteinleiter (PageRuler Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas) wurde nicht aufgeköcht, ist sofort sichtbar und ermöglicht dadurch ein direktes Überwachen der Elektrophorese sowie gezieltes Zerteilen der Nitrozellulosemembran in einem bestimmten kDa-Bereich.

Mittels der 10 µl Pipette und den Gelbeladespitzen (gel loading tips, Hartenstein) wurden in jede Tasche 5 µl der Probe gefüllt, von den Proteinleitern wurden 10 µl verwendet.

Jede Probe sowie der interne Standard wurden zweifach bestimmt. In die erste Tasche wurde der Biotin-Marker, anschließend der Standard sowie die Proben und in die vorletzte die Proteinleiter zur Transferkontrolle gegeben. Die letzte der 15 Taschen konnte nicht zur Proteinbestimmung genutzt werden und wurde mit Probenpuffer befüllt, um ein ungleichmäßiges Laufen der Banden zu verhindern.

Das Gel wurde nach folgendem Schema beladen:

Reagenz	PL 1	Int. St.	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	PL 2	SB
Bahn	1	2 3	4 5	6 7	8 9	10 11	12 13	14	15
Menge [µl]	10	5	5	5	5	5	5	10	5

Tab. 3: Pipettierschema für Gelelektrophorese. PL steht für Proteinladder (PL 1 = Biotinylated Protein Ladder; PL 2 = PageRuler Prestained Protein Ladder Plus), Int. St. für Internen Standard (Probe 9831) und SB für Sample Buffer (Probenpuffer). Da die Proben der Membranfraktion eine Konzentration von 2 µg/µl aufwiesen, entsprachen 5 µl der Probe immer 10 µg an Protein.

Die Laufkammer wurde mit dem Netzgerät (Computer Controlled Electrophoresis Power Supply Modell 3000 XI, BIO-RAD) verbunden, nachdem der Deckel der Novex-Kammer aufgesetzt worden war. Bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA wurde für ca. 50 Minuten geblottet.

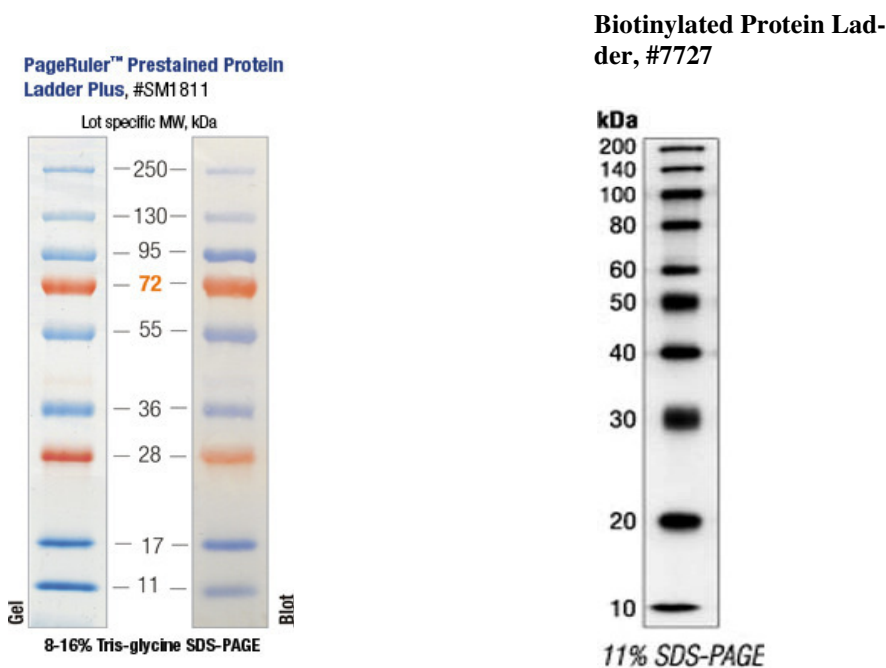


Abb.12: Für die SDS-Page verwendete Proteinleitern. Links: PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas), rechts: Biotinylated Protein Ladder (Cell Signaling).

2.2.4.2.2 Elektroblot

Für das Gewebe des Nucleus Accumbens wurde das semi-dry Verfahren, für das Gewebe des Putamen das Tank-Blot Verfahren angewendet.

2.2.4.2.2.1 Semi-dry Verfahren

100 ml des Transferpuffers (10fach konzentriert) wurde mit 700 ml Aqua bidest. und 200 ml 100% reinem Methanol vermischt, so dass eine einfache Konzentration entstand. Die rechte obere Ecke der Nitrozellulosemembran wurde zur Markierung abgeschnitten und die Membran mit der aktuellen Versuchsnummer beschriftet. Diese Blottingmembran sowie 4 Stück dickes und 6 Stück dünnes Filterpapier wurden für ca. 10 Minuten in dem Transferpuffer eingeweicht. Währenddessen wurde die Gel-Kassette mit einem Metallspatel an den Seiten aufgebrochen. Das durch den Probenpuffer blau markierte Sammelgel wurde mit einem Skalpell zurecht geschnitten, mit einem Spatel an einer Ecke angehoben und dann sehr vorsichtig abgezogen, um ein Reißen der dünnen Gelschicht zu verhindern. Anschließend wurde das Gel ebenfalls in ein Schälchen mit Transferpuffer gelegt. Nun wurden zwei mit Transferpuffer getränkte dicke Filterpapiere auf die Anode der Blottingkammer gelegt. Es folgen drei der sechs mit Transferpuffer getränkten dünnen Blottingpapiere sowie die Nitrozellulosemembran, die so aufgelegt wurde, dass die Markierung nach rechts oben zeigte. Nach dem möglichst geraden Auflegen des Gels wurde es mit drei weiteren dünnen Blottingpapieren bedeckt.

Um eventuell vorhandene Luftblasen zu beseitigen, die den Transfer stören würden, wurde eine Glaspipette behutsam auf den oben liegenden dünnen Blottingpapieren hin- und hergerollt. Der Stapel wurde mit zwei dicken Blottingpapieren komplettiert und die Kathode im Deckel der Kammer mit etwas Transferpuffer eingerieben, um eine Austrocknung des Gels durch Verdunstung zu vermeiden. Danach wurde die Kathode auf die Anode aufgesetzt und an das Netzgerät angeschlossen. Mit einer konstanten Stromstärke von 135 mA wurde für 90 Minuten geblottet.

2.2.4.2.2.2 Wet-(Tank)-Blot Verfahren

Zunächst wurden ca. 2 Liter des einfach konzentrierten Transferpuffers mind. eine halbe Stunde, besser noch über Nacht bei 4°C im Kühlraum vorgekühlt. Die Nitrozellulosemembran und das Gel wurden 15 Minuten in mit Eiswürfeln gekühlten Schälchen in Transferpuffer eingeweicht. Ebenfalls in eisgekühlte Schälchen mit Transferpuffer wurden zwei Schwämme, zwei dicke Filterpapiere und vier dünne Filterpapiere gegeben. Die Tank-Blot-Kammer wurde in eine große Wanne mit Eiswasser gestellt, um die beim Blotten entstehende Wärme möglichst gut auszugleichen und ein Aufquellen des Gels zu verhindern. Die Kammer wurde schon einmal zur Hälfte mit gekühltem Transferpuffer gefüllt. Die aus zwei flexibel miteinander verbundenen Metallgittern bestehende Haltevorrichtung für das Gel und die Nitrozellulosemembran wurde mit dem schwarzen Metallteil nach unten auf ein Tablett gelegt. Auf das Metallgitter wurde zunächst ein mit kaltem Transferpuffer getränkter Schwamm gelegt, gefolgt von einem dicken und zwei dünnen Filterpapieren. Nun wurde das Gel mit der Proteinleiter (PageRuler Prestained Protein Ladder Plus) nach links aufgelegt und direkt auf dem Gel durch Rollen einer Glaspipette eventuelle Luftblasen entfernt. Dann folgte die Nitrozellulosemembran, die auch noch einmal mittels Glaspipette eng auf das Gel aufgerollt wurde. Den Rest des Stapels bildeten wieder ein dickes Filterpapier, zwei dünne Papiere und ein Schwamm. Schließlich wurde das rote Metallstück über den Stapel geklappt und in die Halterung im Tank Blot gesteckt. Dabei sollte die rote Metallseite zur roten Wand des Tankblots ausgerichtet sein, das schwarze Metall zur schwarzen Wand. Der restliche Transferpuffer wurde in die Blotting-Kammer gefüllt, der Deckel verschlossen und bei konstanten 280 mA geblottet.

2.2.4.2.3 Ponceau-S-Färbung

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran vorsichtig mit einer Pinzette entnommen und zum Schutz vor Austrocknung in ein Schälchen mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gelegt. Ein erfolgreicher Transfer ließ sich an dem vollständig auf die Membran übertragenen Prestained Markers abschätzen.

Zur weiteren Beurteilung des Transfers sowie zum Sichtbarmachen der Proteinbanden vor dem Schneiden der Membran in Streifen wurde die sog. Reversible Ponceau-S-Färbung durchgeführt: nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran solange in der Ponceau-S-Lösung (P7170-1L, Sigma) geschwenkt, bis sich die Proteinbanden nach ca. 2-5 Minuten rot anfärbten. Der Hintergrund der Membran erschien rosa. Nun wurde die Membran im jeweils entsprechenden Bereich geschnitten. EAAT 1 (ca. 55 kDa) und EAAT2 (ca. 65 kDa) wurden zusammen auf einem Streifen zwischen 40 und 70 kDa belassen. Der Bereich mit kleineren und größeren Molekülgrößen wurde weiteren Analysen anderer Arbeiten zugeführt.

Nach dem Anfärben wurde die mehrfach verwendbare Ponceau-S-Lösung wieder in das lichtgeschützte 15 ml-Röhrchen zurück geschüttet und vollentsalztes Wasser zur Membran gegeben. Dadurch schlug die Hintergrundfarbe der Membran wieder von rosa nach weiß um und die Proteinbanden traten stärker hervor. Das VE-Wasser wurde weggeschüttet und 0,1 M NaOH auf die Membran gegossen, um sie wieder vollständig zu entfärben. Die Dauer, bis die Banden unter ständigem Schwenken endgültig verschwunden sind, beträgt ca. 1-2 Minuten. Es sollte möglichst zügig vorgegangen werden, da bei zu langer Einwirkzeit der NaOH die Proteinbanden beschädigt werden. Die Natronlauge wurde dann in ein Abfallgefäß verworfen und die Membran dreimal für ungefähr eine Minute in VE-Wasser geschwenkt, um die restliche Natronlauge zu entfernen. Die mittlerweile wieder völlig weiße Membran wurde nun in 5%iger Milchlösung über Nacht im Kühlraum bei ca. 4°C geblockt.

2.2.4.2.4 Immunfärbung und deren Visualisierung

Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht im Kühlraum bei 4°C in 5%iger Milchlösung geblockt, d.h. dass die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membran durch das in der Milch enthaltene Proteingemisch besetzt wurden. Um Milchreste zu entfernen, wurde die Membran anschließend für drei Minuten in Tween-PBS (Waschpuffer) auf dem Schüttler mit ca. 50 rpm gewaschen. Der erste Primärantikörper α -

EAAT1 (novocastra) wurde sowohl für das Gewebe Putamen als auch für Nucleus Accumbens im Verhältnis 1: 1000 in der Tween-PBS-Lösung verdünnt.

Der zweite Primär-Antikörper α -EAAT2 (novocastra) wurde für das Gewebe Putamen im Verhältnis 1: 20 000 in Tween-PBS gelöst, für das Gewebe Nucleus Accumbens im Verhältnis 1:5000. Die Membran wurde in den jeweiligen Lösungen für eine Stunde inkubiert und anschließend für zweimal drei Minuten, einmal 15 Minuten und zweimal fünf Minuten mit Tween-PBS gewaschen.

Dann wurde sowohl der an Meerrettichperoxidase gekoppelte Sekundär-Antikörper (Anti-Maus-IgG von Biorad) im Verhältnis 1: 3000 als auch der Biotin-Antikörper (Cell-Signaling) für die Proteinleiter im Verhältnis 1:1000 in 5%ige Milch-Lösung gegeben. Wieder wurde die Membran darin für eine Stunde auf dem Schüttler geschwenkt und im Anschluss für zweimal drei Minuten, einmal 15 Minuten und zweimal fünf Minuten ebenfalls auf dem Schwenker mit Tween-PBS von den Antikörperresten gereinigt. Während der Waschzeiten wurde schon einmal das Programm „Image Reader LAS-3000“ der Intelligent Dark Box gestartet, damit die Kamera ausreichend Zeit hatte, auf -25°C herunter zu kühlen.

Während aller Wasch- und Inkubationszeiten befanden sich die Schalen, in denen die Nitrozellulosemembran lag, auf einem Schüttler, der auf ca. 50 rpm eingestellt war.

Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran unter einer Abdeckung aus Alufolie zum Lichtschutz für ca. eine Minute in Super-ECL (enhanced Chemiluminescence)-Lösung geschwenkt und in derselben Wanne zügig zur Intelligent Dark Box transportiert.

Dort wurde kontrolliert, ob die Kamera tatsächlich auf -25°C herunter gekühlt war. Die Membran wurde auf ein Filterpapier gelegt und dieses auf dem schwarzen Tablett des Image Readers platziert.

Nun wurde die Messung gestartet und so in 10 Minuten 10 Bilder mit exakt der gleichen Belichtungszeit von 60 Sekunden hergestellt. Die Bilder wurden auf dem Computer gespeichert und für die Auswertung auch auf einen USB-Stick kopiert. Die eindeutig beschriftete Nitrozellulosemembran wurde in einem, mit PBS gefüllten 50ml-Röhrchen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.2.4.2.5 *Verwendete Lösungen*

Folgende Lösungen wurden für den Western-Blot-Assay verwendet:

Protein-/Proben-Puffer (2fach konz.)	
Tris-HCL pH 6,8	100 mM
DTT	200 mM
Glycerol	20%
SDS	4%
Bromphenolblau	+

Phosphate Buffered Saline (PBS) (10 fach konz.)	
NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
ad 1000 ml mit aq. dest., pH 7,4 mit HCl	

Transferpuffer			
1fach		10fach	
Tris	48 mM	Tris	58 g/l
Glycin	39 mM	Glycin	29 g/l
SDS	0,037%	20%ige SDS-Lsg.	18,5 ml/l
Methanol	20%		
Verdünnung (von 10fach auf 1fach)			
10fach Puffer		100 ml	
H ₂ O		700 ml	
100%iges Methanol		200 ml	

ECL-Nachweisreagenz	
Detection reagent 1	50% [v/v]
Detection reagent 2	50% [v/v]

Waschpuffer	
Tween 20 in PBS	0,1% [v/v]

Milchlösung (Blockingpuffer)	
Tween 20 Magermilchpulver in PBS	0,1% [v/v] 5,0% [w/v]

2.2.4.2.6 Auswertung des Western Blots

Die Bilder der Blots wurden in TIF-Format umgewandelt, so dass sie im „Adobe Photoshop 8.0“ dargestellt werden konnten. In diesem Programm besteht die Möglichkeit, die Grauwerte der Bilder zu invertieren, d.h. weiße Banden auf schwarzem Hintergrund konnten in schwarze Banden auf weißem Hintergrund umgewandelt werden. Für alle Bilder wurde die Darstellung schwarzer Balken auf weißem Hintergrund gewählt und dann die einzelnen Banden mit der Software „Image J“ ausgewertet. Hierbei wurde die Dichte der einzelnen Banden errechnet und mit einem Zahlenwert angezeigt. Von der Dichte der Bande wurde auf die Proteinmenge geschlossen, d.h. je höher die Zahl, umso mehr Protein ist vorhanden.

Da jede Probe doppelt bestimmt worden war, konnte aus dem für jede Bande berechneten Zahlenwerten die mittlere Bandenstärke ermittelt werden. Um die Werte verschiedener Gele vergleichbar zu machen, wurden die Werte der einzelnen Banden zum Wert des Internen Standards (Bahn 2 und 3) – welcher auf jedem Gel in gleicher Menge aufgetragen worden war – in Beziehung gesetzt. Auf diese Weise wurde der Anteil an den beiden glutamatergen Transportern EAAT1 und EAAT2 im Gewebe des Putamen und Nucleus Accumbens semiquantitativ bestimmt.

2.2.4.3 Troubleshooting

2.2.4.3.1 Antikörper

Da sowohl der Antikörper α -EAAT1 als auch α -EAAT2 (novocastra) nur für menschliches Gewebe erprobt worden war, musste zu Beginn der Versuchsreihe erst getestet werden, ob mit den beiden Antikörpern überhaupt eine Bindung an das Hirngewebe von Rhesusaffen möglich war. Dies gelang auf Anhieb, allerdings zeigte sich auch, dass die vom Hersteller gemachten Angaben zur Einsatzkonzentration des Antikörpers für unsere Zwecke viel zu hoch waren. Deshalb wurden etliche Verdünnungsreihen angelegt, in denen versucht wurde, die günstigsten Antikörper-Konzentrationen zu finden. Als Proteingemisch wurden zunächst jeweils 20 μ g Hirngewebe des Nucleus Accumbens eines an AIDS erkrankten indischen Rhesusaffen pro Bande ausgewählt, das sich aufgrund des großen Proteingehalts konstant gut anfärben ließ. Ziel war es, auch bei geringerer Proteinmenge die Banden gut darstellbar zu machen und gleichzeitig aber überbelichtete und zu breite Banden bei hohem Proteinanteil zu vermeiden.

Mit Hilfe der Intelligent Dark Box (s. unten) wurde dann auch schnell die optimale Konzentration des Antikörpers ermittelt: für das Gewebe des Putamen erwies sich eine

Konzentration von 1:1000 für EAAT1 und 1:20 000 für EAAT2, für das Gewebe des Nucleus Accumbens ergaben sich die besten Ergebnisse mit einer Konzentration von 1:1000 für EAAT1 und 1:5000 für EAAT2.

Der Sekundärantikörper α -Mouse (Biorad) brachte in einer Verdünnung von 1:3000 in Milchlösung optimale Resultate. Für den α -Biotin-Antikörper (Cell Signaling) zum Anfärben der biotinylierten Proteinleiter wurde eine ausreichende Konzentration von 1:1000 in Milchlösung ermittelt.

Des Weiteren wurde ein Teststreifen nur mit Sekundär-Antikörper behandelt. Beim Anfärben ergab sich kein Signal, was beweist, dass die Primär-Antikörper wirklich spezifisch binden und die Banden nicht nur durch den Sekundär-Antikörper erzeugt werden.

2.2.4.3.2 *Standard*

Um eine Vergleichbarkeit der Bandenstärke auf verschiedenen Gelen zu gewährleisten, musste ein interner Standard gesucht werden. Dieses Proteingemisch sollte sich möglichst zuverlässig und stark anfärben lassen. Da sich humaner Cortex sowie die Membranfraktion des Temporalen Cortex von Rhesusaffen nicht bzw. nur sehr schlecht mit den EAAT-Antikörpern anfärben ließen, wurde die Probe 9831 als interner Standard (und auch als Grundlage für die folgenden Verdünnungsreihen mit der Röntgenfilm- und mit der Dark-Box-Methode) verwendet. Es handelt sich hierbei um die Membranfraktion des Nucleus Accumbens eines Rhesusaffen aus China, der SIV-infiziert und mit Apomorphin behandelt worden war.

2.2.4.3.3 *Gruppierung/Auftragen der Proben*

In den Vorversuchen wurden immer nur die Proben von Versuchstieren einer pharmakologischen oder infektiösen Gruppe gleichzeitig aufgetragen (also z.B. nur Proben der uninfizierten, unbehandelten Kontrolltiere). Es stellte sich mit der Zeit jedoch als sinnvoller heraus, Kontrolltiere, SIV-infizierte Tiere und behandelte Tiere in einem Gel gleichzeitig aufzutragen, obwohl dadurch unter Umständen einige Proben mehr verbraucht wurden. Der Vorteil dieses Vorgehens liegt darin, dass die Vergleichbarkeit zwischen den Belichtungszeiten der Proben der verschiedenen Versuchsgruppen (neben der Absicherung durch den internen Standard) verbessert wurde. Außerdem mussten so am Ende der Versuchsreihe nicht noch einmal gesondert repräsentative Blots angefertigt und somit wertvolles Probenmaterial verbraucht werden.

2.2.4.3.4 Blottingverfahren

Zu Beginn der Vorversuche wurden sowohl die Proben des Putamen als auch des N.Accumbens mit dem semi-dry Verfahren vom Gel auf die Membran transferiert. Da sich das Gewebe des Putamen als wesentlich empfindlicher gegenüber den gelegentlich entstehenden Hitzeschäden des semi-dry Verfahrens erwies und zudem das vorhandene Probenvolumen des Putamen sehr knapp bemessen war, wurde ein Tank Blot (Perfect Blue Tank-Elektroblotter, Peqlab) angeschafft. Mit diesem neuen Gerät war der Proteintransfer tatsächlich schonender und gründlicher möglich.

2.2.4.3.5 Inkubations- und Blockingzeiten

Das Blocking, also das Absättigen der freien Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran, fand über Nacht vom ersten auf den zweiten Versuchstag im Kühlraum bei ca. 4°C statt. Die Inkubationszeit der Antikörper am zweiten Versuchstag konnte von den anfänglichen 2 Stunden auf jeweils eine Stunde reduziert werden. Das anfängliche Schema mit Blocking über 2 Stunden bei RT und die Inkubationszeit des ersten Antikörper ÜN im Kühlraum wurde verworfen, da eine Stunde Inkubationszeit völlig ausreichend für eine sehr gute Bindung des Antikörpers waren und auf diese Weise der zeitliche Aufwand pro Versuchstag in etwa gleich war.

2.2.4.3.6 Anzahl der verwendeten Gele

Aus Gründen der Effektivität wurde nach einigen Wochen Einübung der Versuchsmethode statt nur einem Gel immer zwei Gele gleichzeitig analysiert. Drei oder gar vier Gele zogen Fehler oder Ungenauigkeiten beim Vorgehen nach sich.

2.2.4.3.7 Belichtungsmethode

Leider erwies sich die Zielsetzung der guten Darstellbarkeit mit der anfangs verwendeten Methode der Visualisierung als äußerst schwierig: hierbei wurde die Membran in der Dunkelkammer in einer Filmkassette auf einen Röntgenfilm projiziert und mittels Entwickler- und Fixierlösung sichtbar gemacht. Trotz Vorgehen nach Stoppuhr war es sehr problematisch, alle Signale deutlich abzubilden und gleichzeitig eine Überbelichtung zu verhindern. Oft machten schon 10 Sekunden Belichtungszeit kürzer oder länger einen gravierenden Unterschied. Da die Banden für EAAT1 bei ca. 55 kDa und jene für EAAT2 bei ca. 65 kDa liegen, war es zu riskant, die eng aneinander liegenden Banden vorher mit Hilfe der Proteinleiter zu trennen. Bei gleichzeitiger Abbildung beider Banden verliefen diese aber oft ineinander. Häufig auftretende Schlieren, die im Lauf des Entwicklungsprozesses auftraten, erschwerten die Darstellung zusätzlich.

Deshalb wurde schließlich dazu übergegangen, als alternative Belichtungsmethode die Intelligent Dark Box (FUJI Film Luminescent Image Analysator LAS-3000) zu wählen, bei der die Belichtungszeit ganz exakt maschinell bestimmbar ist. Die oben aufgeführten Probleme traten mit dieser neuen Methode nicht mehr auf.

2.2.5 Bestimmung des TNF- α

2.2.5.1 Bestimmung des TNF- α im Putamen

2.2.5.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ermöglicht es, in vitro von geringsten Mengen an DNA gezielt Sequenzen definierter Länge (bis zu 3000 Basenpaare) exponentiell zu vervielfältigen. Hierbei wird die Fähigkeit von DNA-Polymerasen ausgenutzt, aus Einzelstrang-DNA vollständige doppelsträngige DNA-Moleküle zu synthetisieren. Jedes Syntheseprodukt dient als Ausgangsstoff für den nächsten Zyklus, so dass eine exponentielle Vervielfältigung stattfindet („Kettenreaktion“).

Die nötigen Grundbestandteile einer PCR bestehen aus der Original-DNA mit dem zu amplifizierenden Abschnitt („template“ oder „Matritzenstrang“) und zwei Primern – ca. 20-30 Basen lange, synthetisch hergestellte Oligonukleotide –, die komplementär zu bestimmten Endbereichen der DNA-Einzelstränge sind und so den zu vervielfältigenden Bereich eingrenzen. Die zugefügte thermostabile Polymerase (wie z.B. Taq-Polymerase) sorgt für die Replikation des DNA-Einzelstranges, indem sie die ebenfalls benötigten Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) komplementär zur DNA an die Primermoleküle anfügt. Die DNA-Polymerase benötigt für ihre Funktion außerdem Mg^{2+} -Ionen und Pufferlösungen, welches beides meist dem sog. Mastermix beigelegt ist.

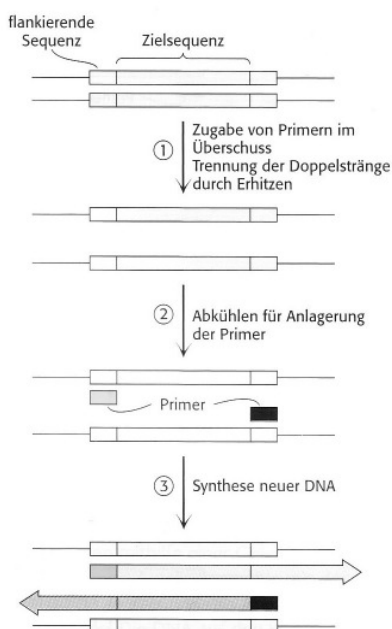


Abb. 13: Polymerasekettenreaktion (PCR): Ein Zyklus besteht aus 3 Schritten: Trennung der Stränge durch Denaturierung, Hybridisierung mit den Primern und Verlängerung der Primer durch DNA-Synthese in der Amplifikationsphase. Aus Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2007), S. 155.

Durch Erhitzen der Original-Doppelstrang-DNA im Thermocycler auf $96^{\circ}C$ wird diese sowie die zugegebenen Primer durch Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen in zwei Einzelstränge getrennt („Denaturierung“: ① in Abb. 13). Die Temperatur wird

dann für ca. 30 Sekunden konstant gehalten, um eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA zu ermöglichen („Primerhybridisierung“: ② in Abb. 13). Meist liegt diese Temperatur 2-3°C unter dem Schmelzpunkt der Primersequenzen und entspricht normalerweise ca. 55-65°C. In der Amplifikationsphase (③ Abb. 13) füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge beginnend am 3'-Ende mit freien Nukleotiden auf. Die Temperatur beträgt meist 68-72°C je nach gewähltem Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase.

2.2.5.1.1.1 Standard PCR

Die Standard PCR wurde in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet, um verschiedene Primer für die Real Time PCR zu testen.

Es wurde ein PCR-Mastermix (peqGOLD PCR-Mastermix, peqLab) mit Taq-DNA-Polymerase verwendet. Diese Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium „*thermophilus aquaticus*“ und besitzt ein Temperaturoptimum bei 72°C. Pipettierschema für eine Standard-PCR:

12,5	µl	peqGOLD PCR-Mastermix (peqLab)
1,0	µl	Vorwärtsprimer (100 ng/µl)
1,0	µl	Rückwärtsprimer (100 ng/µl)
2,0	µl	Plasmid-DNA (100 ng/µl)
8,5	µl	H ₂ O bidest.
25,0	µl	Gesamtvolumen

Die Reaktionsansätze wurden stets auf Eis in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, wobei der Mastermix mit der Polymerase stets zum Schluss dazu gegeben wurde. Vor der Amplifikation im Thermocycler (BioRad) wurde der Reaktionsansatz noch einmal resuspendiert. Folgendes PCR-Programm wurde eingestellt:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung	5 Min., 96°C
25-30 Zyklen	Denaturierung	30 Sek., 96°C
	Primer Annealing	30 Sek., Temp. je nach Primer
	Elongation	1.000 Nukleotide/Min. (Taq), 72°C
1 Zyklus	Finale Elongation	10 Min., 72°C
1 Zyklus	Kühlung	4°C

Je nach Länge des erwarteten Produkts und nach Polymerase wurde die Elongationszeit abgeschätzt.

Um die PCR-Produkte zu analysieren, wurde im Anschluss eine Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.5.2) durchgeführt. Stimmt die Länge der Amplifikate mit der erwarteten Nukleinsäurenlänge überein, konnte das PCR-Produkt gereinigt (s. 2.2.5.4) und für weitere Experimente eingesetzt werden.

Es stellte sich heraus, dass die Primer TNF- α -forward #77 und TNF- α -reverse #78 am besten für eine Analyse von TNF- α mittels Real-Time-PCR geeignet waren, was zur Sicherheit nochmals mittels Real-Time-PCR kontrolliert wurde (s. 2.2.5.1.1.2). Diese Herstellung des Real-Time-PCR-Produkts mit den TNF- α -Primern diene gleichzeitig als Grundlage für die Herstellung der Verdünnungsreihe für die Analyse der cDNA des Putamens mittels Real-Time-PCR.

2.2.5.1.1.2 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der Standard PCR (s. 2.2.5.1.1.1), ermöglicht aber zusätzlich noch die Quantifizierung der amplifizierten Nukleinsäuren. In Kombination mit dem Verfahren der RT-PCR (reverse Transkriptase PCR) kann so die relative Expression eines bestimmten Gens auf der Ebene der Transkription detektiert werden. Um die Menge der Nukleinsäuren bestimmen zu können, werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die sich unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagern (interkalieren). Für die Analysen der vorliegenden Arbeit wurde hierzu SYBRGreen (Qiagen) verwendet, dessen Fluoreszenz mit einer im Thermocycler integrierten Kamera gemessen wurde. Die Basis zur Berechnung der relativen Genexpressivität beruht auf der Korrelation zwischen der Menge der DNA und der Intensität der Fluoreszenz. Die Messung der Fluoreszenz findet jeweils am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt, wobei eine wirkliche Quantifizierbarkeit nur am Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation gegeben ist. Um diesen optimalen Zeitpunkt zu erkennen, wird der sog. CT-Wert (Cycle Threshold) ermittelt: dieser gibt den Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Durch Vergleich mit der Verdünnungsreihe des Standards kann die Konzentration der ds-DNA bestimmt werden.

Die Effizienz der Real-Time PCR wird am einfachsten analysiert, indem die Steigung der Standardkurve berechnet wird. Diese wird aus den CT-Werten der einzelnen Verdünnungsstufen gebildet und liegt bei 100%, wenn sich die Amplifikate pro Zyklus verdoppeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt, d.h. es erfolgte eine Normalisierung gegen bis zu vier Referenzgene: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Aminolevulinate- δ -synthase 1 (ALAS 1), 18s ribosomale RNA (RRN18s) sowie Ribosomales Protein L13a (RPL13A).

Ein Nachteil der beschriebenen Methode besteht in ihrer geringen Spezifität: es kann nicht zwischen verschiedenen PCR-Produkten unterschieden werden. Zur Bestimmung

der Primerspezifität wird deshalb am Ende der Real-Time PCR eine sog. Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die DNA bei sich kontinuierlich erhöhender Temperatur aufgeschmolzen wird (von 50°C bis 95°C). Da unspezifisch entstehende Primerdimere einen niedrigeren Schmelzpunkt haben als die spezifischen PCR-Produkte, ist auf diese Weise eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Gipfels der Schmelzkurve ist ungefähr proportional zur Menge des gebildeten spezifischen DNA-Fragments. Als Primer für diese Arbeit wurde auf bereits im Labor des Instituts für Virologie zur Verfügung stehende Primer zurück gegriffen, die dort vor einiger Zeit entwickelt worden waren. Der Primer TNF- α -fw (#77) amplifizierte die Basensequenz atggcagagagagggtgacc und TNF- α -rev (#78) die Sequenz tactcccaggtcctcttca des TNF- α -Gens. Für beide Primer lag die Schmelztemperatur bei 50°C.

Die PCR wurde in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (ABgene) durchgeführt. Die Proben bestanden aus cDNA des Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen, die bereits zur Verfügung standen. Zu Beginn wurde jeweils 1 μ l der Proben-cDNA sowie 1 μ l des Standards in allen 10 Verdünnungsstufen von 10^{-2} bis 10^{-10} pro Vertiefung vorgelegt. Für die restlichen Reagenzien wurde ein Mastermix erstellt, der sich pro Vertiefung wie folgt zusammensetzte:

10,00	μ l	Sybr Green (Qiagen)
0,25	μ l	Fluorescein (1:1000 verdünnt)
1,00	μ l	Primer TNF- α fw (#77)
1,00	μ l	Primer TNF- α rev (#78)
7,75	μ l	H ₂ O
20,0	μl	Gesamtvolumen

Aufgrund der unausweichlichen Verluste durch Abstreifen der Pipette, zurückbleibenden Resten in Pipettenspitzen etc. wurde im Ansatz 20 μ l Volumen gewählt, tatsächlich aber nur 19 μ l in jede Vertiefung pipettiert.

Die Proben und der Standard wurden jeweils dreifach, der Nullwert nur einfach bestimmt. Die Platte wurde mit Klebefolie versiegelt (Adhesive Seal, BioRad), kurz zentrifugiert und dann im ICycler IQ (BioRad) der Real Time PCR zugeführt. Das PCR Programm für die Real-Time PCR gestaltete sich wie folgt:

1 Zyklus	Aktivierung der Polymerase	5 Min., 95°C
45 Zyklen	Denaturierung	10 Sek., 95°C
	Kombinierte Primeranlagerung und Verlängerung	30 Sek., 60°C
1 Zyklus	Denaturierung	1 Min., 95°C
1 Zyklus	Startpunkt der Schmelzkurve	1 Min., 52°C
86 Zyklen	Schmelzkurve mit $\Delta T=0,5^\circ\text{C}$	10 Sek., 52°C
1 Zyklus	Lagerung	beliebig, 15°C

Zur Auswertung der quantitativen Real Time PCR wurden zunächst die relativen Quantitäten der jeweiligen Proben für die Referenzgene berechnet. Anschließend wurde das geometrische Mittel der Quantitäten für jede einzelne Probe ermittelt und dieses als Normalisierungsfaktor für die Quantifizierung der Expression des Zielgens benutzt. Endergebnis der Berechnungen war die normalisierte relative Expression der jeweiligen Probe im Vergleich zur Probe mit dem höchsten Expressionsniveau. Zur Normalisierung dienten die oben genannten vier Referenzgene (nach den Prinzipien von Vandempele et al. (2002) im Bedienerhandbuch des geNorm VBA Applet für Microsoft Excel).

2.2.5.2 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Größenbestimmung von PCR-Produkten, Plasmid-DNA und Restriktionsfragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Durch ihre starke negative Ladung bewegen sich Nukleinsäuren im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, wobei kurze DNA-Moleküle in dem Agarosenetzwerk schneller wandern als längere. Zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten Fragmente wurden verschiedene Marker (s. Abb. 14) eingesetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und entwickelt unter UV-Licht eine 100fach stärkere Eigenfluoreszenz, wodurch die Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden konnten.

Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels wurden 2g Agarose abgewogen und in 100 ml 1x TAE-Puffer durch 2minütiges Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt war, wurde die verdampfte Flüssigkeit mit aq.bidest. aufgefüllt sowie 6 µl Ethidiumbromid (1µg/µl) zugegeben und durch leichtes Schwenken in der Lösung verteilt. Die Flüssigkeit wurde in eine Gelgießkammer (institutseigene Werkstatt) gegossen und ein Kamm zur Formung von Geltaschen in die Kammer eingebracht. Das auspolymerisierte Gel wurde in eine Gelkammer (institutseigene Werkstatt) mit 1 x TAE-Puffer gelegt, nachdem die Gelkämme entfernt worden waren. Das 1:6 mit 6fach Probenpuffer (für Standard PCR-Produkte: Mass Ruler Loading Dye Solution 6fach (Fermentas); für die Real-Time-PCR-Produkte: Orange Loading Dye Solution 6fach (Fermentas)) verdünnte PCR-Produkt wurde zu jeweils 30 µl in 3 Geltaschen gefüllt. Anschließend wurde 10 µl Marker (Standard PCR-Produkt: Mass Ruler Low Range Ladder (Fermentas), Real Time PCR-Produkt: O'Range Ruler – 50 bp DNA Ladder von Fermentas) aufgetragen.

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer Spannung von 130 Volt für ca. 60 Minuten. Anhand des farbigen Probenpuffers konnte der Lauf der Banden gut verfolgt werden. In der PCR-UV-Kammer (Gel Imager, INTAS) wurden die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Bilder im Computer abgespeichert.

Folgende Marker wurden verwendet:

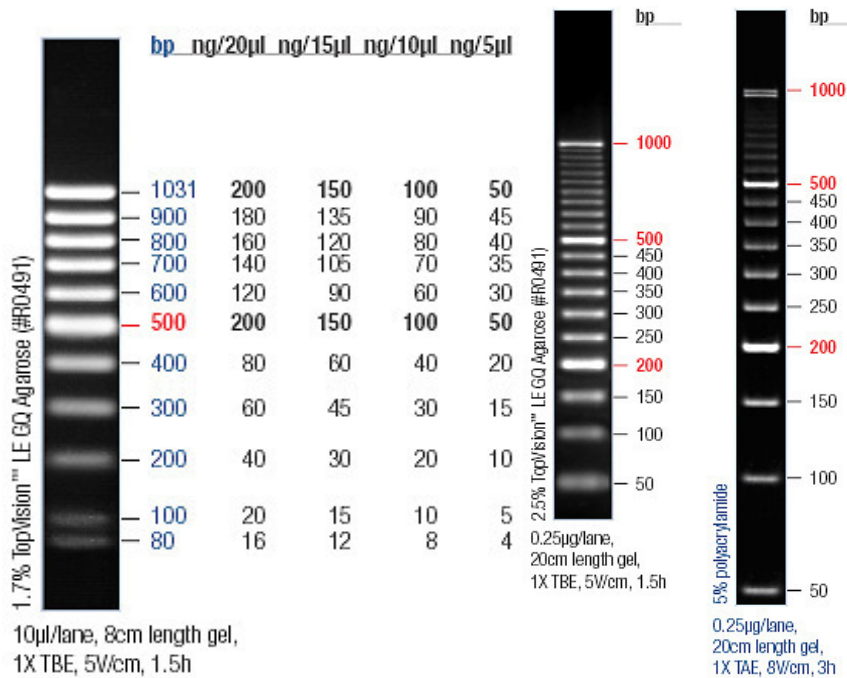


Abb. 14: Verwendete Größenstandards für die Agarosegelelektrophorese. Links: Mass Ruler DNA Ladder Low Range (Fermentas), rechts: O'Range Ruler 50 bp DNA Ladder (Fermentas).

Sowohl das mittels Standard als auch Real-Time PCR hergestellte Produkt lag mit den Primern TNF- α -forward #77 und TNF- α -reverse #78 im gewünschten Bereich.

2.2.5.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch PCR amplifizierte TNF- α -Nukleinsäuren wurden aus 2%igem Agarosegel (s. 2.2.5.2) gewonnen, um eine standardisierte Verdünnungsreihe für die Real-Time-PCR über den Gehalt an TNF- α der cDNA des Putamens durchzuführen.

Unter UV-Licht wurden mit einem in zuvor Ethanol getränkten und dann abgeflammt Skalpellen die Gelbanden herausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen (850 μ g). Die Aufreinigung der in dem Gelstück enthaltenen Nukleinsäuren er-

folgte nach Herstellerprotokoll mit Hilfe des GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich):

Die Gel-Solubilization-Lösung wurde im Verhältnis 3:1 (v/v) zum Gel hinzugefügt und im Heizblock bei 60°C für 10 Minuten inkubiert, wobei die Lösung des Gels durch wiederholtes zwischenzeitliches Vortexen erleichtert wurde. Zur Extraktion der DNA wurde eine spezielle Filtersäule verwendet, die aus einer Säule (Gen Elute Binding Column G) und einem Reaktionsgefäß (Microcentrifuge collection tube 2 ml) bestand (s. Abb. 15).

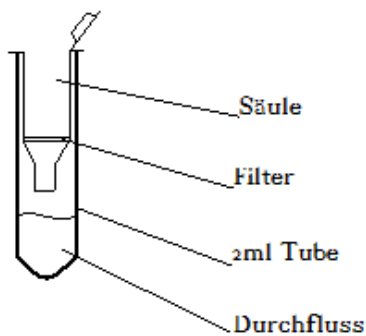


Abb. 15: Microcentrifuge collection tube (Sigma-Aldrich) mit integrierter Gen Elute Binding Column G (Sigma-Aldrich).

Zur Vorbereitung auf die eigentliche Gelextraktion wurden 500 µl Column Preparation Lösung in die Säulen pipettiert und für 1 Min. mit 13.000 rpm zentrifugiert. Bei ausreichender Lösung erscheint die Lösung gelb. Der Durchfluss wurde verworfen. 2 Gel-Volumenanteile 100%iges Isopropanol wurden zu dem gelösten Agarosegel gegeben und kurz gevortext.

700 µl dieses Lösungsansatzes wurden in die vorbereitete Säule pipettiert und für 1 Min. mit 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis der gesamte Ansatz den Filter der Säule durchlaufen hatte. Nach Zugabe von 700 µl Waschlösung (Wash Solution Concentrate G) auf die Säule wurde nochmals mit gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um überschüssigen Waschpuffer zu entfernen erfolgte erneutes Zentrifugieren mit anschließendem Verwerfen des Durchflusses samt 2 ml Gefäß. Die Säule wurde auf ein neues 2 ml Gefäß gesetzt und die im Filter absorbierte DNA mit 50 µl RNase freiem aq. bidest. eluiert. Nach 1-minütiger Inkubation erfolgte die abschließende Zentrifugation. In den 50 µl Durchfluss befindet sich nun die gelöste cDNA.

5 µl der so gelösten cDNA wurden mit 95 µl RNase freiem Wasser in einem Reaktionsgefäß gemischt und in eine UV-Küvette überführt. Mittels Photometer (Perkin-Elmer) wurde die Extinktion der Lösung bei 230 nm gemessen. Es ergab sich eine Konzentration von 0,009 µg/µl dsDNA/cDNA.

Unter Zugabe von 40 µl RNase freiem Wasser wurden mit 5 µl cDNA eine 1 ng/µl konzentrierte Lösung hergestellt. Daraus konnte nun eine Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻¹⁰ angelegt werden, die als Standard zum Vergleich der zu analysierenden Proben des Putamens diente.

2.2.5.4 Bestimmung des TNF-α im Nucleus Accumbens

2.2.5.4.1 Prinzip des ELISA

Am Beispiel des Monkey TNF-α Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) wird im Folgenden das allgemeine Prinzip der spezifischen Quantifizierung von Proteinen mittels ELISA-Technik beschrieben.

Der Antikörper gegen das nachzuweisende Protein, im vorliegenden Fall der Anti-monkey TNFα Antikörper, ist am Boden der Vertiefungen der Mikrotiterplatte adsorbiert.

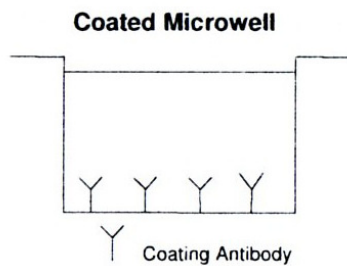


Abb. 16: Ein Antikörper gegen das nachzuweisende Protein ist am Boden der Vertiefungen gebunden. Aus Bender MedSystems (2008), S. 4.

An diesen Antikörper bindet sich das in den Gewebeproben der Affen enthaltene Protein, hier das TNFα.

Für die erste Inkubation wird ein Biotin-konjugierter Antikörper in die Vertiefungen gegeben, der sich an das am Boden der Vertiefung durch den ersten Antikörper gebundene Protein TNFα heftet.

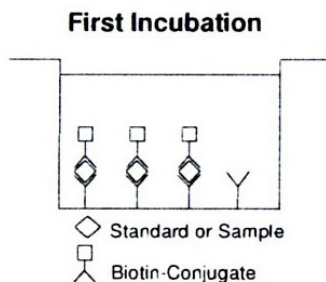


Abb. 17: Erster Inkubationsschritt: ein zweiter, mit Biotin verbundener Antikörper bindet an das nachzuweisende Protein der Probe, das durch den ersten Antikörper am Boden der Vertiefungen festgehalten wird. Aus Bender MedSystems (2008), S. 4.

Nicht gebundener Biotin-konjugierter Antikörper wird in einem Waschschrift entfernt. Als Nächstes wird ein dritter Antikörper – Streptavidin-HRP – in die Vertiefungen gegeben, der sich wiederum mit dem Biotin-konjugierten Antikörper verbindet.

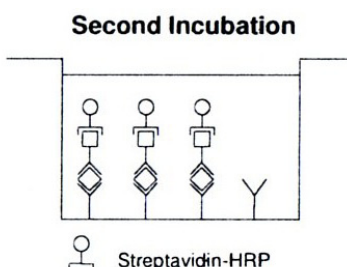


Abb. 18: Zweiter Inkubationsschritt: ein dritter Antikörper „Streptavidin-HRP“ bindet an den zweiten mit Biotin konjugierten Antikörper. Aus Bender MedSystems (2008), S. 4.

Überschüssiges Streptavidin-HRP wird wieder ausgewaschen und die Substratlösung, die mit dem HRP reagiert, wird in die Vertiefungen gegeben.

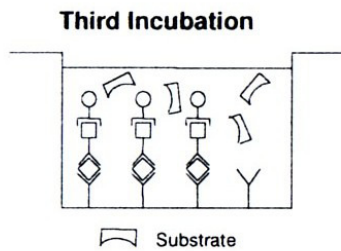


Abb. 19: Dritter Inkubationsschritt: die Substratlösung bindet an den Streptavidin-HRP-Antikörper. Aus Bender MedSystems (2008), S. 4.

Die Verbindung der Substratlösung mit dem Streptavidin-HRP-Antikörper bringt ein farbiges Produkt hervor, das je nach Menge des in den Proben und dem Standard enthaltenen TNF α unterschiedlich intensiv ausfällt.

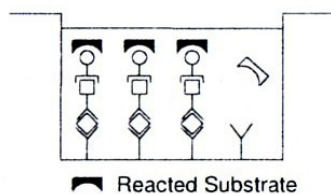


Abb. 20: Farbige Reaktionsprodukt der an HRP gebundenen Substrat-Lösung, das mengenmäßig genau das in der Probe vorhandene Protein wiedergibt. Aus Bender MedSystems (2008), S. 5.

Diese Reaktion wird durch die aus Phosphorsäure bestehende Stopplösung beendet und die Absorption bei 450 nm gemessen. Mittels der sieben TNF- α Standardlösungen wird eine Standardkurve berechnet, anhand derer die Konzentration von TNF- α in den Proben der Affen ermittelt wird (Bender MedSystems, 2008).

2.2.5.4.2 *Protokoll des Vorgehens beim ELISA*

Gemäß der mitgelieferten Anleitung zum Monkey TNF- α ELISA BMS644/3 (Bender MedSystems, 2008) wurde der im Kit enthaltene 20-fach konzentrierte Waschpuffer sowie der ebenfalls 20-fach konzentrierte Assaypuffer mit destilliertem Wasser auf einfache Konzentration verdünnt. Nun wurden alle 96 mit monoklonalem Anti-TNF- α -Antikörper bedeckten Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit jeweils ca. 300 μ l des Waschpuffers ausgewaschen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Waschpuffer 10-15 Sekunden in den Vertiefungen einwirkt und dass diese zu keinem Zeitpunkt austrocknen. Der Waschvorgang wurde einmal wiederholt.

100 μ l des mitgelieferten Probenpuffers wurde in alle 16 für die Standardlösung bestimmten Vertiefungen gegeben und mit 100 μ l der rekonstituierten Monkey TNF α -Standardlösung aufgefüllt. Um die nötigen Verdünnungsstufen zu erreichen, wurde die Flüssigkeit nun mit Hilfe der Pipette gut durchgemischt und mit einer neuen Pipettenspitze wiederum 100 μ l dieser Mischung in die zweite Vertiefung der ersten Standardreihe übergeführt. Diese Prozedur wurde bis zur Vervollständigung der Standardreihe

fortgesetzt und die überschüssigen 100 µl der letzten Verdünnungsstufe verworfen, so dass jede Vertiefung sich am Ende aus 50 µl Standardlösung und 50 µl Probenpuffer zusammensetzte. Zur Kontrolle wurden außerdem zwei Vertiefungen nur mit 100 µl Probenpuffer gefüllt.

Anschließend wurden in die restlichen Vertiefungen jeweils 50 µl Probenpuffer pipettiert und mit 50 µl der Cytosolfraktion der Proteinproben vervollständigt. Das 1:100 mit Assaypuffer verdünnte Biotin-Konjugat wurde zu jeweils 50 µl in alle Vertiefungen – also in diejenigen für Proben, Standard und Kontrolllösung – pipettiert. Proben, Standard und Kontrolle wurden doppelt bestimmt.

Nun wurde die ELISA-Platte zum Inkubieren mit einer Schutzfolie bedeckt für zwei Stunden bei RT auf einen Rotator mit 100 rpm gestellt. Danach konnte die Folie entfernt, die Mikrotiterplatte entleert und viermal mit Waschpuffer entsprechend dem obigen Waschvorgang gereinigt werden.

Als zweiten Antikörper wurde eine 1:200 verdünnte Streptavidin-HRP-Lösung hergestellt. Dieses Konjugat wurde zu jeweils 100 µl in alle 96 Vertiefungen pipettiert und die Platte wieder mit Abdeckfolie für eine Stunde bei RT und 100 rpm auf einem Rotator inkubiert. Danach wurde die Folie entfernt und alle 96 Vertiefungen wie zuvor viermal gewaschen, um sie anschließend mit jeweils 100 µl TMB (Tetramethyl-Benzidine) Substratlösung zu füllen. Um direkten Lichteinfall auf diese UV-empfindliche Lösung zu vermeiden, wurde die Platte mit Alufolie bedeckt 10-20 Minuten unter regelmäßiger Beobachtung auf dem Schüttler geschwenkt. Bei Umschlag der gelben Substratlösung in blaue Farbe wurde schnell die Stopplösung (1M Phosphorsäure) zu jeweils 100 µl in jede Vertiefung pipettiert. Nun konnte die Platte in den ELISA-Reader zur Analyse bei 450 nm als primäre Wellenlänge gegeben werden.

2.2.6 Statistik und graphische Darstellung der Ergebnisse

Die Auswertung der Rohwerte sowie ein Teil der graphischen Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Image J zum Markieren der Banden und Excel XD für die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen und -fehler. Einige Graphiken wurden mittels GraphPadPrism erstellt, das ebenfalls für die Berechnung der statistischen Tests verwendet wurde. Um die Signifikanz der Gruppenunterschiede zu beweisen, wurde ein paarweiser Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Versuchsgruppen durchgeführt ($p \leq 0,05$). Da durch die geringe Anzahl an Versuchstieren pro Gruppe

keine Gauss'sche Normalverteilung angenommen werden konnte, wurde der non-parametrische Mann-Whitney-U-Test (zweiseitig) verwendet.

Es wurde sowohl für den Nucleus Accumbens als auch das Putamen:

- für den Gesamtvergleich aller chinesischen und indischen Affen (s. 3.3.1.1):
 - die Gesamtheit aller chinesischen und indischen Kontrollen vs. die Gesamtheit aller chinesischen und indischen SIV-Infizierten sowie die Gesamtheit aller chinesischen und indischen an AIDS erkrankten Tiere, sowie
 - die Gesamtheit aller chinesischen und indischen SIV-infizierten mit der Gesamtheit aller chinesischen und indischen an AIDS erkrankten Rhesusaffen verglichen.
- für die Infektionsgruppe (s. 3.3.1.2, 3.3.1.3 sowie 3.4.1):
 - ein Vergleich der chinesischen unbehandelten uninfizierten Kontrollen mit den chinesischen SIV-infizierten Affen, wie auch
 - ein Vergleich der indischen unbehandelten uninfizierten Kontrollen mit den indischen SIV-infizierten sowie den (überwiegend indischen) an AIDS erkrankten Rhesusaffen,
 - ein Vergleich der SIV-infizierten indischen mit den (überwiegend indischen) an AIDS erkrankten Tiere gezogen.
- für den Vergleich der Herkunftsländer (s. 3.3.1.4 und 3.4.1):
 - die unbehandelten uninfizierten chinesischen Kontrollen vs. die unbehandelten uninfizierten indischen Kontrollen, und
 - die SIV-infizierten chinesischen vs. die SIV-infizierten indischen Versuchstiere gestellt.
- für die Behandlungsgruppen (s. 3.3.2 und 3.4.2):
 - die Kontrollgruppe bestehend aus uninfizierten Tieren mit SIV-infizierten, unbehandelten Rhesusaffen,
 - die Kontrollgruppe der uninfizierten Rhesusaffen mit den uninfizierten, mit Selegilin behandelten Tieren,
 - die uninfizierten mit Selegilin behandelten mit den infizierten mit Selegilin behandelten Affen, sowie
 - die Gruppe der unbehandelten SIV-infizierten Affen mit den behandelten SIV-infizierten Tieren (Selegilin, Memantin, NAC, Melatonin) verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Probenpräparation

Für die Analyse der relativen Proteinexpression wurden zunächst Gewebehomogenate des Putamens und des Nucleus Accumbens nach Jarabek et al. (2004) fraktioniert. Anschließend wurde die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) für alle drei Proteinfractionen – Totalhomogenat, Cytosol- und Membranfraktion – durchgeführt.

3.1.1 Proteingehalt im Putamen

Durchschnittlich wurden für das Putamen Proben mit einem Trockengewicht von nur $24,26 \pm 3,48$ mg eingewogen, da nur wenig Gewebe Verfügung stand. Nach der Fraktionierung und der Durchführung des Bradfordassays ergaben sich folgende Werte:

Tab. 5: Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) des Proteingehalts [μg] des Totalhomogenats, der Membranfraktion und der Cytosolfraction im Putamen sowie Anzahl der analysierten Gewebeprobe.

	Proteingehalt [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] im Putamen		
	Totalhomogenat	Membranfraktion	Cytosolfraction
Mittelwert	4,71	3,67	1,86
SD	1,14	0,72	0,39
S.E.M.	0,17	0,11	0,06
Anzahl	47		

Zur Veranschaulichung soll auch hier eine repräsentative Eichgerade für die Membranfraktion im Putamen aufgeführt werden (Abb. 21):

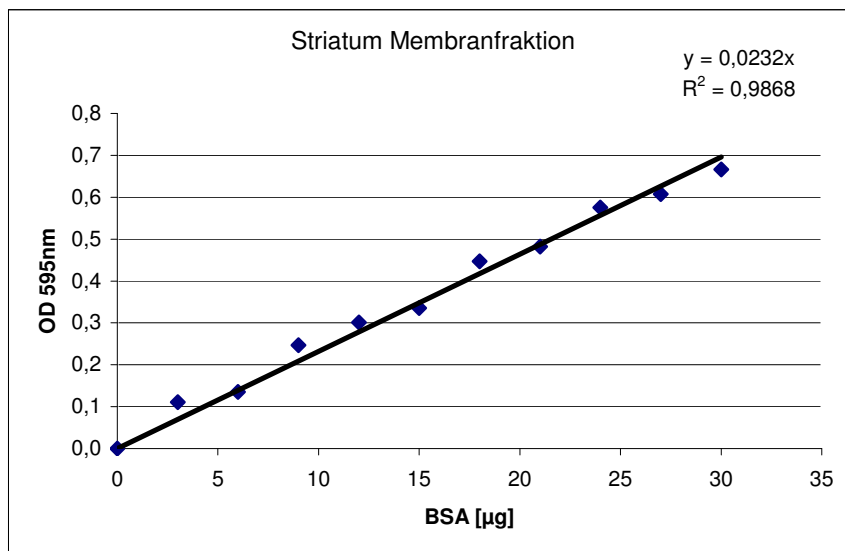


Abb. 21: Repräsentative Eichgerade der Proteinbestimmung nach Bradford für die Membranfraktion im Putamen. Die optische Dichte (OD) bei 595 nm (y-Achse) ist gegen die entsprechende Menge an eingesetztem bovines Serumalbumin (BSA) (x-Achse) aufgetragen. Die Wahrscheinlichkeit der linearen Abhängigkeit ist durch den Determinationskoeffizienten R^2 gegeben und beträgt hier 98,7%. Die Steigung der Gerade $m = 0,0232$ wurde für die Berechnung der gesuchten Proteinmenge eingesetzt.

3.1.2 Proteingehalt im Nucleus Accumbens

Für das Gewebe des Nucleus Accumbens wurden im Mittel Proben mit einem Trockengewicht von $51,98 \pm 5,11$ mg eingewogen und zu Homogenaten verarbeitet. Der durch Bradfordassay bestimmte Gesamtproteingehalt der verschiedenen Fraktionen ist in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tab. 4.: Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) des Proteingehalts [µg] des Totalhomogenats, der Membranfraktion und der Cytosolfraktion im Nucleus Accumbens sowie Anzahl der analysierten Gewebeproben.

	Proteingehalt [µg/µl] im Nucleus Accumbens		
	Totalhomogenat	Membranfraktion	Cytosolfraktion
Mittelwert	3,78	4,99	1,9
SD	0,44	0,83	0,43
S.E.M.	0,06	0,11	0,05
Anzahl	61		

Beispielhaft soll hier eine Eichgerade für die Membranfraktion im Nucleus Accumbens gezeigt werden:

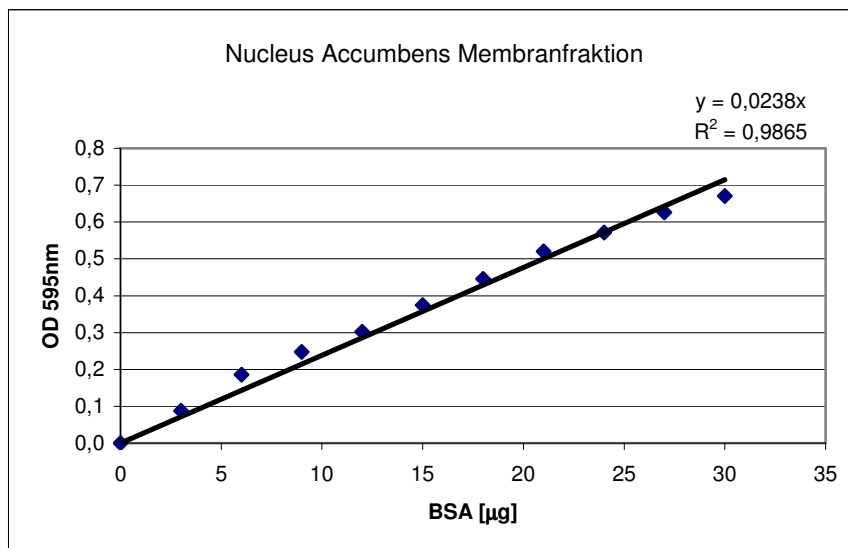


Abb. 22: Repräsentative Eichgerade der Proteinbestimmung nach Bradford für die Membranfraktion im Nucleus Accumbens. Die optische Dichte (OD) bei 595 nm (y-Achse) ist gegen die entsprechende Menge an eingesetztem bovines Serumalbumin (BSA) (x-Achse) aufgetragen. Die Wahrscheinlichkeit der linearen Abhängigkeit ist durch den Determinationskoeffizienten R^2 gegeben und beträgt hier 98,7%. Die Steigung der Gerade $m = 0,0238$ wurde für die Berechnung der gesuchten Proteinmenge eingesetzt.

3.2 Proteinexpression der Ladekontrolle GAPDH im Putamen und Nucleus Accumbens

Als Voraussetzung für die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse wurde in unserer Arbeitsgemeinschaft für alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchstiere die Expression des Proteins GAPDH mit Western Blots bestimmt. Da GAPDH als Protein des basalen Metabolismus in allen Zellen vorkommt, eignet es sich als Indikator für die allgemeine Proteinexpression. Würde sich diese zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen deutlich unterscheiden, könnte man Änderungen der Expression spezifischer, für diese Arbeit relevante Proteine wie EAATs oder $TNF-\alpha$ nicht ausschließlich auf die Unterschiede im Infektionsstatus oder Behandlungsschema der Rhesusaffen zurückführen. Ein erhöhter allgemeiner Metabolismus könnte z.B. eine Erhöhung eines spezifischen Proteins verursacht haben.

In den folgenden Abbildungen sind repräsentative Blots für die Infektionsgruppierung sowie für die Behandlungsgruppierung 1 und 2 dargestellt:

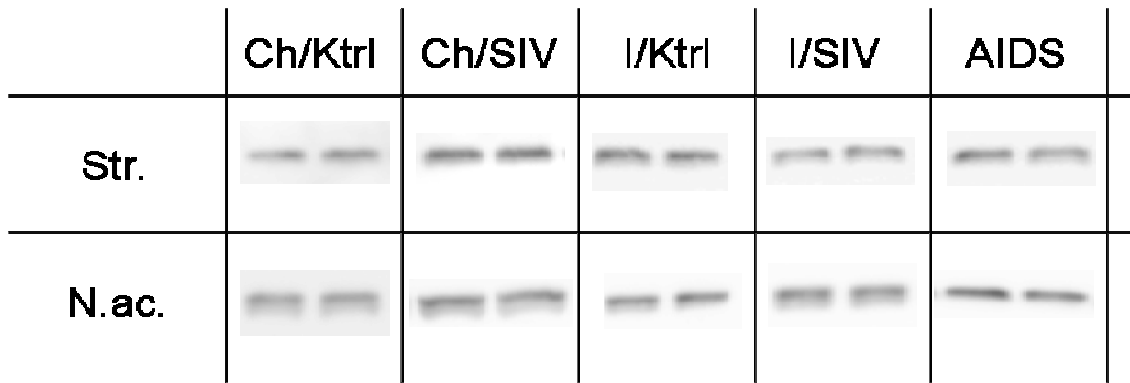


Abb. 23: **Repräsentative Western-Blots für die Expression der Ladekontrolle GAPDH im Putamen (Str.) und im Nucleus accumbens (N.ac.) innerhalb der Infektionsgruppierung.** Dargestellt ist die Expression für die Kontrolltiere chinesischer Herkunft (Ch/Ktrl) und indischer Herkunft (I/Ktrl), für die SIV-infizierten Tiere chinesischer Herkunft (Ch/SIV) und indischer Herkunft (I/SIV) sowie für die AIDS-Gruppe (AIDS). Die Banden konnten in einer Höhe von ungefähr 45kDa detektiert werden. Die Proteinexpression erwies sich über alle Gruppierungen hinweg als konstant (aus Meisner, 2008).

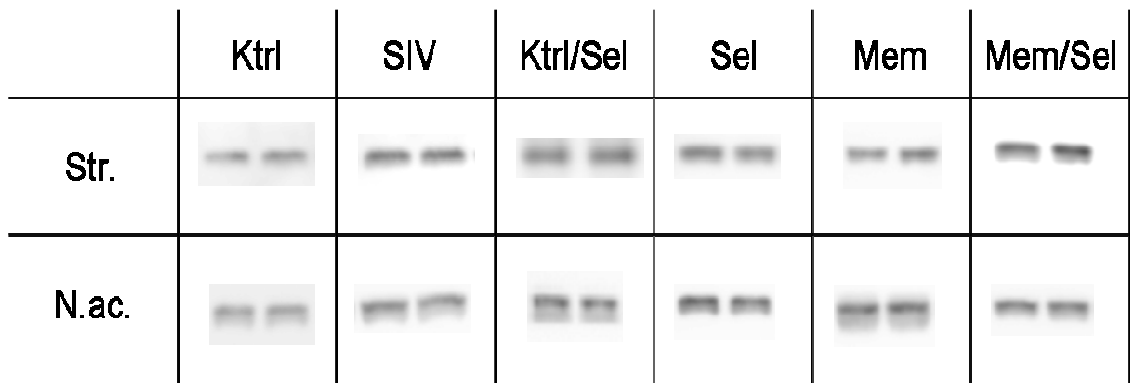


Abb. 24: **Repräsentative Western-Blots für die Expression der Ladekontrolle GAPDH im Putamen (Str.) und im Nucleus accumbens (N.ac.) innerhalb der Behandlungsgruppierung 1.** Dargestellt ist die Expression für die Kontrolltiere (Ktrl), für SIV-infizierte Tiere (SIV), für mit Selegilin behandelte Kontrolltiere (Ktrl/Sel), für mit Selegilin behandelte SIV-infizierte Tiere (Sel), für mit Memantin behandelte SIV-infizierte Tiere (Mem) und für doppelt behandelte SIV-infizierte Tiere (Mem/Sel). Die Banden konnten in einer Höhe von ungefähr 45kDa detektiert werden und die Proteinexpression erwies sich über alle Gruppierungen hinweg als konstant (aus Meisner, 2008).

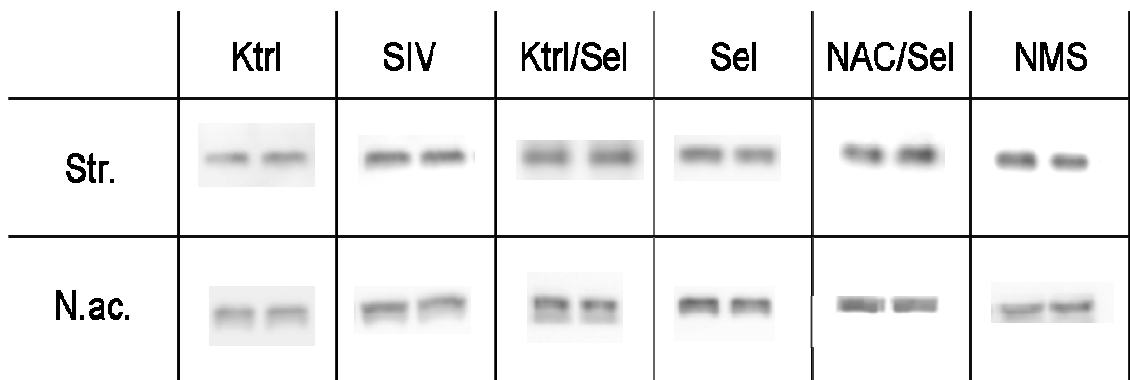


Abb. 25: **Repräsentative Western-Blots für die Expression der Ladekontrolle GAPDH im Putamen (Str.) und im Nucleus accumbens (N.ac.) innerhalb der Behandlungsgruppierung 2.** Dargestellt ist

die Expression für die Kontrolltiere (Ktrl), für SIV-infizierte Tiere (SIV), für mit Selegilin behandelte Kontrolltiere (Ktrl/Sel), für mit Selegilin behandelte SIV-infizierte Tiere (Sel), für mit Selegilin und N-Acetylcystein (NAC) doppelt behandelte SIV-infizierte Tiere (NAC/Sel) und für mit Selegilin, NAC und Melatonin dreifach behandelte SIV-infizierte Tiere (NMS). Die Banden konnten in einer Höhe von ungefähr 45kDa detektiert werden und die Proteinexpression erwies sich über alle Gruppierungen hinweg als konstant (aus Meisner, 2008).

Es zeigte sich eine relativ konstante Expression von GAPDH über alle Versuchstiere sowohl im Putamen als auch im Nucleus Accumbens. Weder die Infektion noch die Behandlung mit verschiedenen Substanzklassen hatte demnach einen signifikanten Einfluss auf die allgemeine Proteinexpression (Meisner, 2008).

3.3 *Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen*

Die relative Proteinexpression der exzitatorischen Aminosäuretransporter 1 und 2 (EAAT1 und EAAT2) wurde mit Western Blots ermittelt. Es folgt zum einen die Darstellung der Ergebnisse für die unbehandelten, SIV-infizierten Rhesusaffen (3.3.1), zum anderen die Darstellung der Ergebnisse für die SIV-infizierten Rhesusaffen mit unterschiedlicher pharmakologischer Behandlung (3.3.2).

Der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) wurden für die jeweiligen Untergruppen in Balkendiagrammen dargestellt. Dabei wurde aus Gründen der Vereinfachung und besseren Vergleichbarkeit die relative Proteinexpression der uninfizierten chinesischen Kontrolltiere gleich 1 gesetzt.

3.3.1 *Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn unbehandelter, SIV-infizierter Rhesusaffen*

Die alleinige Auswirkung der SIV-Infektion ohne weitere pharmakologische Behandlung auf die relative Proteinexpression der beiden glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 im Putamen und Nucleus Accumbens wurde durch den Vergleich von nicht-infizierten Kontrolltieren mit SIV-infizierten sowie an AIDS erkrankten Rhesusaffen bestimmt. Alle für diese Infektionsgruppierung verwendeten SIV-infizierten Tiere zeigten noch keine klinischen Zeichen der Immunschwäche oder neurologischen Ausfälle. Bei den AIDS-Tieren handelt es sich vorwiegend um Tiere indischer Herkunft,

die beim ersten Anzeichen der klinischen, AIDS-definierenden Erkrankungszeichen sowie hoher Viruslast getötet wurden.

Zunächst wurde die relative Proteinexpression der glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 bei der Gesamtheit aller Versuchstiere betrachtet, um einen möglichen generellen Effekt der Infektion bei allen Makakken abschätzen zu können.

Potentielle Veränderungen in der Proteinexpression könnten jedoch durch die undifferenzierte Betrachtung der gemittelten Werte der Versuchstiere aus China und Indien maskiert sein. Deshalb wurden auch die Auswirkungen der Infektion auf die relative Proteinexpression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 sowohl ausschließlich chinesischer als auch ausschließlich indischer Rhesusaffen untersucht.

3.3.1.1 Gesamte relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn unbehandelter, SIV-infizierter chinesischer und indischer Rhesusaffen

Die Gegenüberstellung der relativen Proteinexpression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 sowohl der chinesischen als auch der indischen Rhesusaffen soll einen Überblick über die Auswirkungen der Infektion im Putamen und Nucleus Accumbens geben.

3.3.1.1.1 Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen unbehandelter, SIV-infizierter chinesischer und indischer Rhesusaffen

Anders als bei den im nachfolgenden Kapitel 3.3.1.1.2 erläuterten Zusammenhängen im Nucleus Accumbens ergeben sich im Putamen beim Vergleich der verschiedenen Versuchstiergruppen sowohl für EAAT1 als auch für EAAT2 nur hochsignifikante Unterschiede.

Die relative Proteinexpression von EAAT1 der SIV-infizierten chinesischen und indischen Affen ist gegenüber den chinesischen und indischen uninfizierten Kontrollen signifikant um 60% reduziert. Im Vergleich mit den Kontrollen findet sich in der AIDS-Gruppe der Affen beider Herkunftsländer eine ebenfalls signifikante Verringerung der EAAT1-Expression um ca. 90%. Selbst beim Vergleich der SIV-infizierten Gesamtheit aller Versuchstiere mit allen an AIDS erkrankten Tieren kann eine signifikante, um ca. 75% geringere EAAT1-Expression der AIDS-Tiere ermittelt werden.

Das Expressionsverhalten von EAAT2 im Putamen aller Versuchstiere entsprach in allen Punkten dem des EAAT1 im Putamen der Gesamtheit aller Tiere. Genau wie für EAAT1 fand sich eine signifikante – wenn auch mit etwa 40% geringere – Reduktion der relativen Proteinexpression der SIV-infizierten chinesischen und indischen Rhesusaffen im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen aus China und Indien. Bei den an AIDS erkrankten Tieren ließ sich gegenüber den SIV-infizierten Tieren ebenso wie bei der Situation für EAAT1 ein signifikanter Unterschied von ca. 55 % nachweisen. Der Abfall der relativen Proteinexpression von EAAT2 der AIDS-Gruppe aller Versuchstiere im Vergleich zur aus allen chinesischen und indischen Tieren bestehenden Kontrollgruppe ist mit einer Differenz von 75% zwar ein wenig geringer als bei EAAT1, erreicht aber trotzdem Signifikanzniveau.

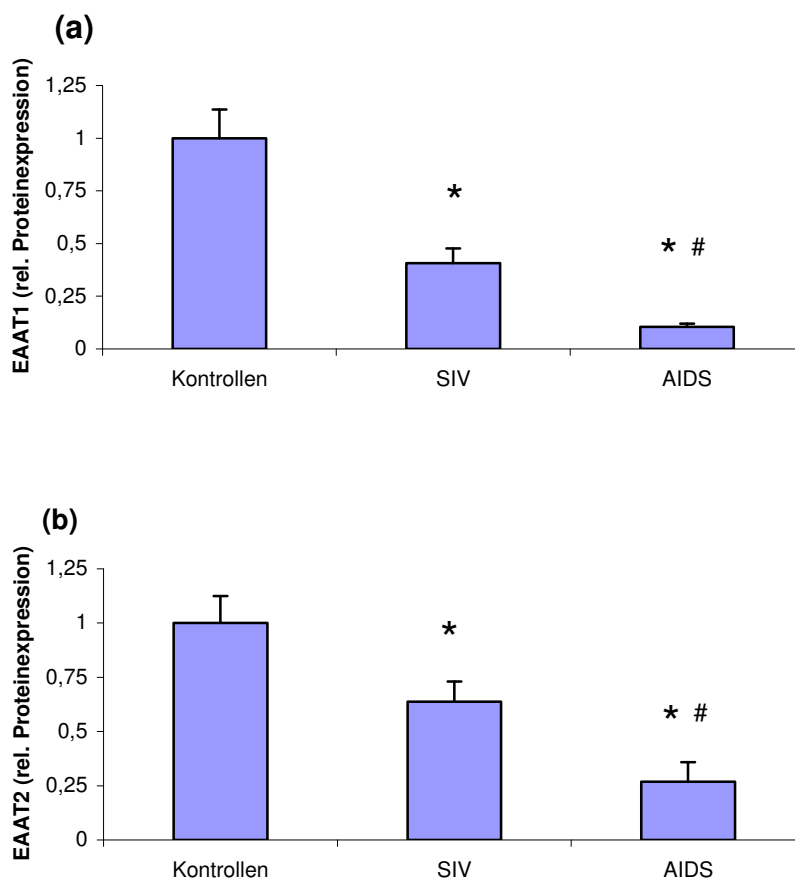


Abb. 26: Relative Proteinexpression von EAAT1 (a) und EAAT2 (b) im Putamen chinesischer und indischer Rhesusaffen.

Die Tiere wurden in 3 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=8: n_{China}=4, n_{Indien}=4), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=12: n_{China}=6, n_{Indien}=6) und SIV-infizierte/unbehandelte an AIDS erkrankte (AIDS, n=5: n_{China}=1, n_{Indien}=4) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen; #: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu SIV (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

3.3.1.1.2 *Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens unbehandelter, SIV-infizierter chinesischer und indischer Rhesusaffen*

Die relative Proteinexpression des EAAT1 im Nucleus Accumbens zeigt in der Gruppe aller SIV-infizierten Affen nur einen leichten Abfall von ca. 20% im Vergleich zur Gesamtheit aller Kontrolltiere. Die Gegenüberstellung aller indischen und chinesischen Tiere, die an AIDS erkrankt waren mit den Kontrollen aus den beiden Ursprungsländern ergibt einen über 30%igen Rückgang der EAAT1-Expression bei erstgenannter Gruppe. Der Wert der relativen Proteinexpression des EAAT1 der AIDS-Gruppe wiederum war um nur ca. 15% erniedrigt verglichen mit der Gesamtheit aller SIV-infizierten Rhesusaffen.

Es ergibt sich also ungefähr dasselbe Bild wie beim EAAT1 des Putamen aller Versuchstiere (s. 3.3.1.1.1), nur dass im Nucleus Accumbens keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen bestehen.

Der EAAT2 des Nucleus Accumbens weicht ein wenig ab von der Tendenz der abnehmenden Proteinexpression bei fortschreitendem Infektionsverlauf, wie er bei EAAT1 oder auch im Putamen festgestellt werden konnte. Im Vergleich aller Kontrolltiere mit der Gesamtheit der SIV-infizierten Tiere zeigte sich nämlich ein leichter Anstieg der EAAT2-Expression von ca. 10%, der aber nicht signifikant wurde und als gleichwertig zur Kontrollgruppe angesehen werden kann. Die AIDS-Erkrankung wiederum ruft bei allen Versuchstieren erwartungsgemäß eine Reduktion der relativen Proteinexpression des EAAT1 hervor, die aber mit 30% im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant wurde. Der Unterschied zwischen allen chinesischen und indischen AIDS-Affen verglichen mit allen SIV-infizierten Makakken beträgt knapp 40%, wodurch die Schwelle zur Signifikanz ebenfalls nicht überschritten wurde.

Insgesamt erkennt man für den EAAT1 und EAAT2 des Nucleus Accumbens also bis auf eine kleinere Ausnahme eine ähnliche Tendenz wie für das Putamen, allerdings ohne entsprechend hohe und damit signifikante Differenzen zwischen den Versuchstiergruppen.

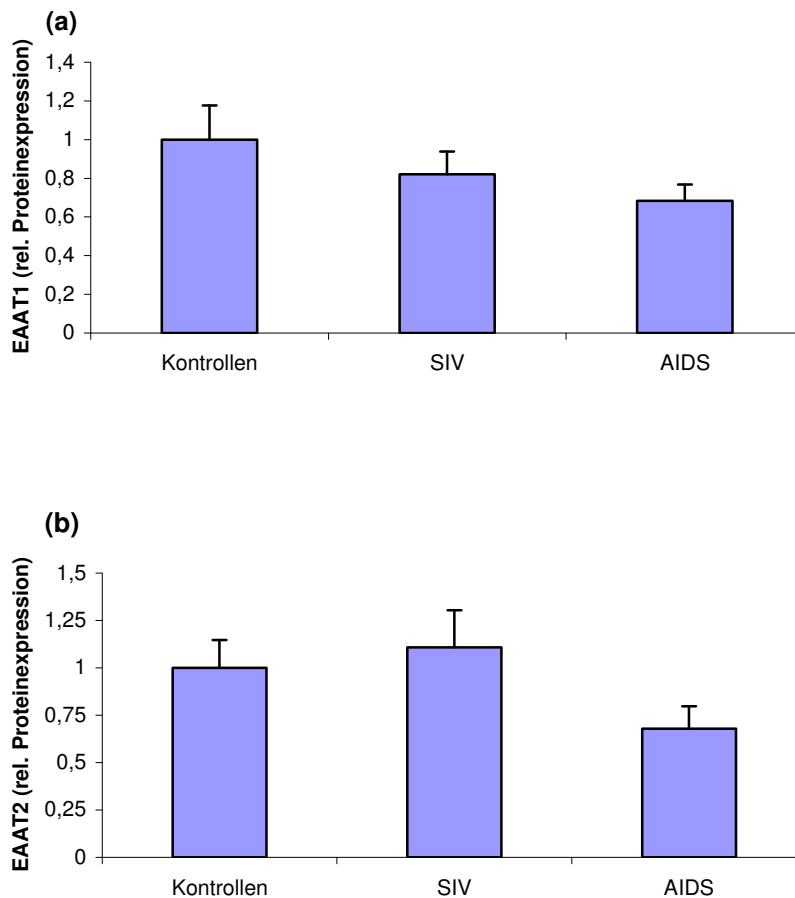


Abb. 27: Relative Proteinexpression von EAAT1 (a) und EAAT2 (b) im Nucleus Accumbens chinesischer und indischer Rhesusaffen.

Die Tiere wurden in 3 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=9: n_{China}=6, n_{Indien}=3), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=9: n_{China}=5, n_{Indien}=4) und SIV-infizierte/unbehandelte an AIDS erkrankte (AIDS, n=5: n_{China}=1, n_{Indien}=4) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M..

3.3.1.2 Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn chinesischer SIV-infizierter Rhesusaffen

Nachfolgend werden die Auswirkungen der Infektion auf die relative Proteinexpression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 in Putamen und Nucleus Accumbens ausschließlich chinesischer Rhesusaffen aufgeführt. Die Balkendiagramme der Mittelwerte wurden noch zusätzlich durch repräsentative Abbildungen der angefertigten Western Blots unterlegt, auf denen EAAT1 bei jeweils 55 kDa und EAAT2 bei 65 kDa detektiert werden konnte. Da sich in der AIDS-Gruppe nur ein chinesischer Affe befindet, konnte für ihn kein Standardfehler angegeben werden.

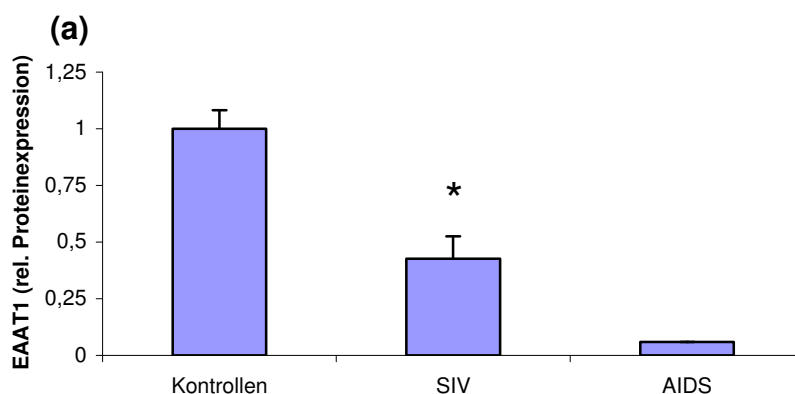
3.3.1.2.1 *Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen chinesischer SIV-infizierter Rhesusaffen*

Hinsichtlich des EAAT1 im Putamen findet sich eine signifikante Reduktion um ca. 60% seiner relativen Proteinexpression bei den chinesischen SIV-infizierten Tieren im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen aus China.

Für den EAAT2 gilt auch, dass dessen relative Proteinexpression in der Gruppe der SIV-infizierten Rhesusaffen im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen vermindert war, allerdings nur um etwa 15%.

Da die Gruppe an AIDS erkrankten Tieren neben indischen nur aus einen chinesischen Affen besteht, konnte weder ein Vergleich zwischen der AIDS-Gruppe und den Kontrollen, noch zwischen den AIDS-Tieren und den SIV-infizierten Rhesusaffen gezogen werden.

Insgesamt bestätigt die gesonderte Betrachtung der chinesischen Tiere die Schlüsse, die bereits aus der Analyse der Gesamtheit aller Versuchstiere (s. 3.3.1.1.1) gezogen worden waren: sowohl EAAT1 als auch EAAT2 werden mit zunehmendem Infektionsverlauf im Putamen vermindert exprimiert.



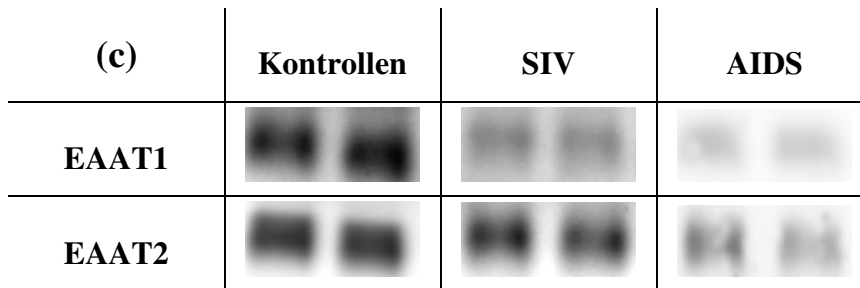
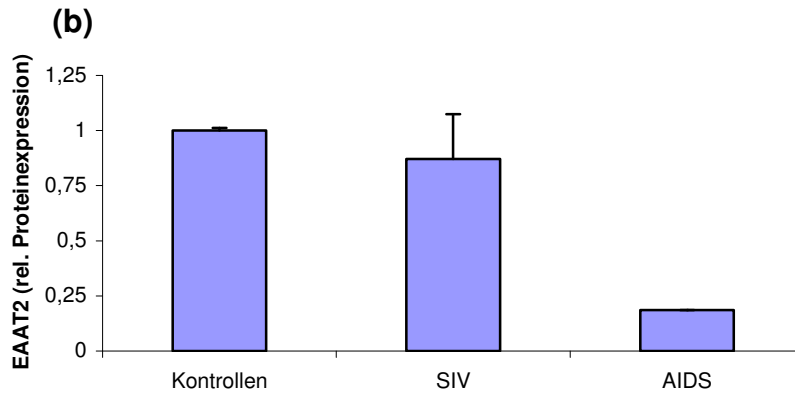


Abb. 28: Relative Proteinexpression von EAAT1 **(a)** und EAAT2 **(b)** im Putamen chinesischer Rhesusaffen.

Die Tiere wurden in 3 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=4), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=6) und SIV-infizierte/unbehandelte an AIDS erkrankte (AIDS, n=1) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

(c) Repräsentative Westernblots von EAAT1 und EAAT2 aus der Gruppe der Kontrollen sowie der SIV- und AIDS-Gruppe.

3.3.1.2.2 *Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens chinesischer SIV-infizierter Rhesusaffen*

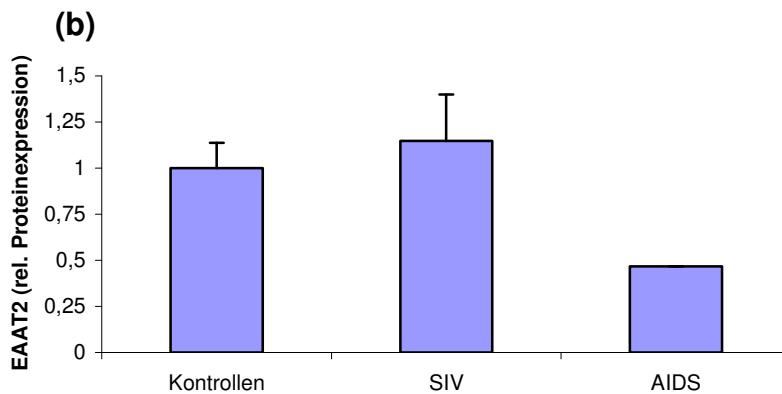
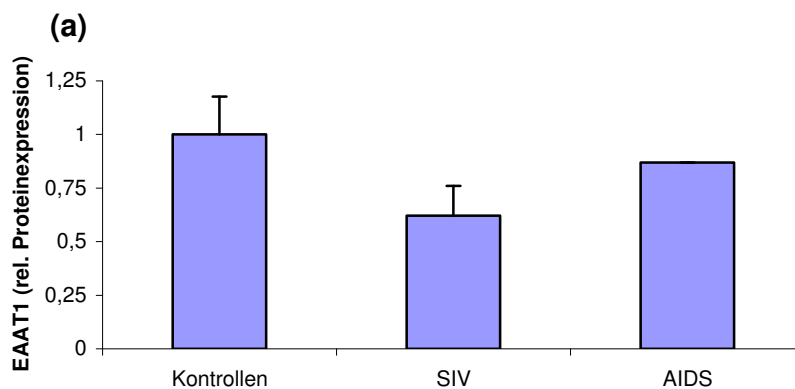
Für die relative Proteinexpression des EAAT1 im Nucleus Accumbens fand sich in der Gruppe der chinesischen SIV-infizierten Rhesusaffen ein Abfall von fast 40% im Vergleich zu den chinesischen uninfizierten Kontrollen. Dies entspricht tendenziell den Ergebnissen für die relative Proteinexpression von EAAT1 im Nucleus Accumbens aller Versuchstiere. Allerdings ist diese Tendenz bei der Gesamtheit aller Tiere schwächer ausgeprägt durch den Einfluss der indischen Tiere, deren Expressionsverhalten dem der chinesischen in diesem Fall genau entgegengesetzt verläuft (s. 3.3.1.1.2 und 3.3.1.3.2).

Bei der Betrachtung des EAAT2 ergibt sich das umgekehrte Bild: die chinesischen SIV-infizierten Tiere exprimieren EAAT2 stärker als die uninfizierten Kontrollen aus China, allerdings nur um etwa 13%. Dies entspricht annähernd den Ergebnissen für

EAAT2 im Nucleus Accumbens für die Gesamtheit aller chinesischen und indischen Affen (s. 3.3.1.1.2).

Statistisch signifikante Veränderungen konnte für keine der genannten Versuchstiergruppen festgestellt werden.

Da die Gruppe an AIDS erkrankten Tieren nur einen chinesischen Affen mit einschließt, konnte weder ein Vergleich zwischen der AIDS-Gruppe und den Kontrollen, noch zwischen den AIDS-Tieren und den SIV-infizierten Rhesusaffen gezogen werden.



(c)

	Kontrollen	SIV	AIDS
EAAT1			
EAAT2			

Abb. 29: Relative Proteinexpression von EAAT1 **(a)** und EAAT2 **(b)** im Nucleus Accumbens chinesischer Rhesusaffen.

Die Tiere wurden in 3 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=6), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=5) und SIV-infizierte/unbehandelte an AIDS erkrankte (AIDS, n=1) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M..

(c) Repräsentative Westernblots von EAAT1 und EAAT2 aus der Gruppe der Kontrollen sowie der SIV- und AIDS-Gruppe.

3.3.1.3 Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn indischer SIV-infizierter Rhesusaffen

Im Anschluss werden die Auswirkungen der Infektion auf die relative Proteinexpression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 in Putamen und Nucleus Accumbens ausschließlich indischer Rhesusaffen beschrieben. Die Balkendiagramme mit Mittelwerten und Standardfehler werden durch repräsentative Abbildungen der angefertigten Western Blots vervollständigt, die wieder EAAT1 bei 55 kDa und EAAT2 bei 65 kDa zeigen.

3.3.1.3.1 *Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen indischer SIV-infizierter Rhesusaffen*

Im Putamen der indischen SIV-infizierten Rhesusaffen konnte eine deutliche Abnahme der relativen Proteinexpression des EAAT1 um mehr als 60% im Vergleich zur Kontrollgruppe aus Indien nachgewiesen werden. Die indische AIDS-Gruppe zeigte die niedrigste EAAT1-Expression aller drei untersuchten indischen Gruppen: ihr Wert lag ca. 65% unter dem der SIV-Infizierten und sogar mehr als 85% unter dem der uninfizierten Kontrolltiere. Der letztgenannte Zusammenhang erreichte Signifikanzniveau.

Bezüglich des EAAT2 im Putamen der indischen Makakken ergaben sich ähnliche Verhältnisse wie für den oben beschriebenen EAAT1: es ist ein kontinuierliches Absinken der relativen EAAT2-Expression über die SIV-infizierten bis zu den an AIDS erkrankten Tieren zu beobachten. Die relative Proteinexpression war bei den SIV-infizierten Affen aus Indien gegenüber den indischen Kontrollen signifikant um die Hälfte verringert. Die nicht signifikante Differenz zwischen den SIV-infizierten Tieren und der Gruppe der an AIDS erkrankten indischen Rhesusaffen beträgt 50%, es handelt sich also wieder um eine Verringerung um genau die Hälfte der Proteinexpression. Das deutlichste Absinken kann jedoch zwischen den uninfizierten indischen Kontrolltieren und

den indischen an AIDS erkrankten Tieren festgestellt werden: der Unterschied von 75% zwischen beiden Gruppen ist signifikant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich auch bei der alleinigen Analyse der indischen Tiere die Tendenz aus Abschnitt 3.3.1.1.1 sowie 3.3.1.2.1 bestätigt: die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 sinkt im Putamen mit zunehmender Dauer der SIV-Infektion.

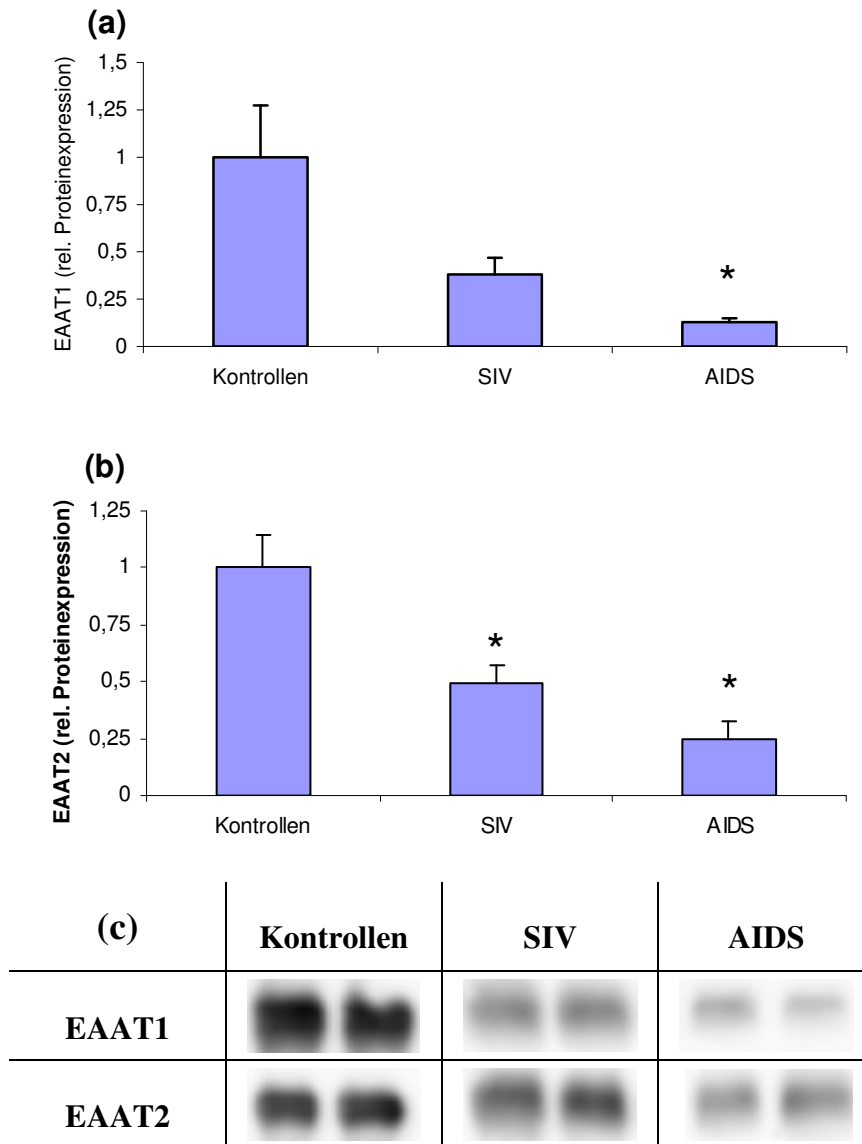


Abb. 30: Relative Proteinexpression von EAAT1 (a) und EAAT2 (b) im Putamen indischer Rhesusaffen. Die Tiere wurden in 3 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=4), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=6) und SIV-infizierte/unbehandelte an AIDS erkrankte (AIDS, n=4) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

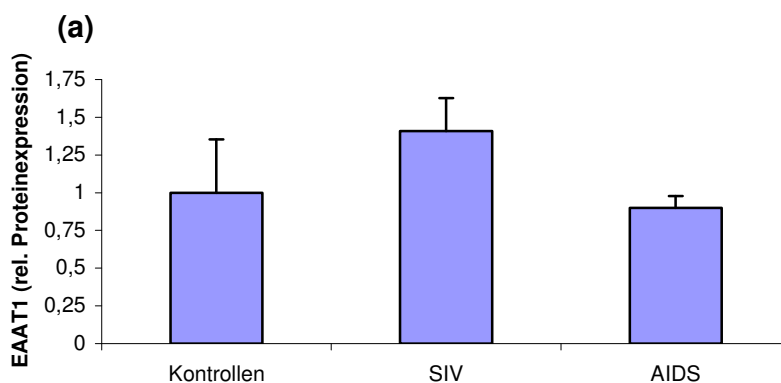
(c) Repräsentative Westernblots von EAAT1 und EAAT2 aus der Gruppe der Kontrollen sowie der SIV- und AIDS-Gruppe.

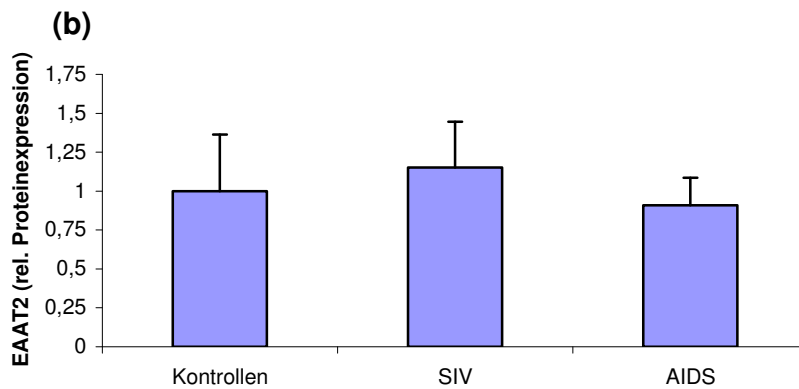
3.3.1.3.2 *Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens indischer SIV-infizierter Rhesusaffen*

Für die relative Proteinexpression des EAAT1 des Nucleus Accumbens lässt sich ein Anstieg um 30% bei den SIV-infizierten indischen Rhesusaffen im Vergleich zu den indischen Kontrollen feststellen. Dies widerspricht dem Trend aller und der chinesischen Versuchstiere im Nucleus Accumbens sowie der chinesischen und indischen Rhesusaffen im Putamen, bei denen stets ein Abfall der EAAT1-Expression bei den SIV-infizierten Tieren zu verzeichnen war. Die an AIDS erkrankten indischen Tiere exprimierten EAAT1 ungefähr in gleichem Ausmaß wie die indischen Kontrollen. Damit lagen sie zu ca. 35% unter dem Wert der SIV-infizierten indischen Makakken.

Die relative Proteinexpression des EAAT2 des Nucleus Accumbens spiegelt im Prinzip das Expressionsverhalten von EAAT1 wider: die EAAT2-Expression der indischen SIV-infizierten Rhesusaffen übersteigt die der indischen Kontrollen um 13%, die EAAT2-Expression der indischen AIDS-Gruppe ist im Vergleich zu den indischen Kontrollen ein wenig erniedrigt. Die Ausprägung der Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstiergruppierungen ist aber so gering, dass die relative Proteinexpression von EAAT2 aller drei Gruppen im Prinzip als gleich ausgeprägt angesehen werden muss.

Wieder ergab sich also für die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens wie schon für die chinesischen (3.3.1.2.2) und die Gesamtheit aller Versuchstiere (3.3.1.1.2) auch für die indischen Rhesusaffen kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen.





(c)	Kontrollen	SIV	AIDS
EAAT1			
EAAT2			

Abb. 31: Relative Proteinexpression von EAAT1 **(a)** und EAAT2 **(b)** im Nucleus Accumbens indischer Rhesusaffen.

Die Tiere wurden in 3 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=3), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=4) und SIV-infizierte/unbehandelte an AIDS erkrankte (AIDS, n=4) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M..

(c) Repräsentative Westernblots von EAAT1 und EAAT2 aus der Gruppe der Kontrollen sowie der SIV- und AIDS-Gruppe.

3.3.1.4 Vergleich der relativen Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn von Rhesusaffen aus China und Indien

Nachfolgend wird der direkte Vergleich der Proteinexpression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 der uninfizierten, SIV-infizierten und an AIDS erkrankten Affen beider unterschiedlicher Herkunftsländer China und Indien gezogen.

3.3.1.4.1 *Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen chinesischer und indischer Rhesusaffen*

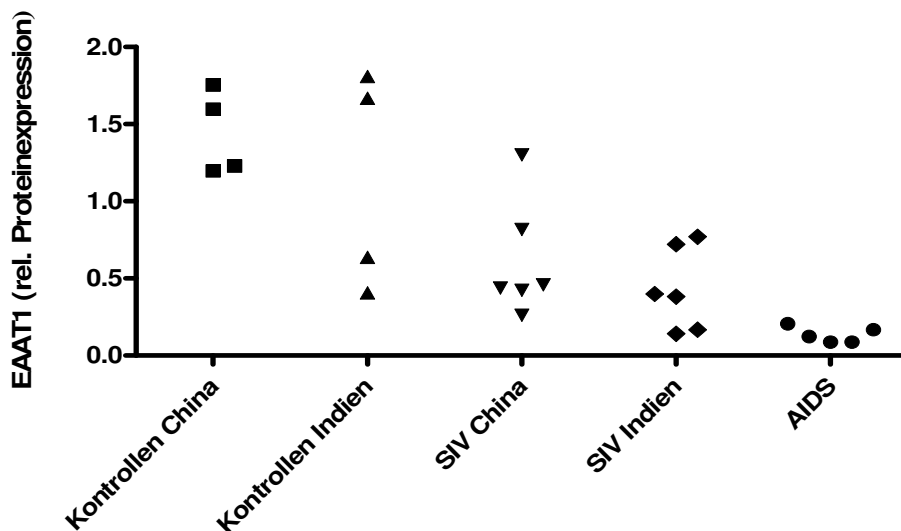
Die Kontrolltiere aus China exprimieren EAAT1 im Putamen ca. 20% stärker als die Kontrollen aus Indien. Auch bei den chinesischen SIV-infizierten Tieren kann eine um 30% höhere EAAT1-Expression als bei den indischen SIV-infizierten Tieren festgestellt werden. Beide Vergleiche erreichen das Signikanzniveau nicht.

Hinsichtlich EAAT2 findet sich ein Anstieg der relativen Proteinexpression von 38% in den indischen Kontrolltieren verglichen mit den chinesischen Kontrollen, der jedoch keine Signifikanz aufweist. Die SIV-infizierten indischen Rhesusaffen zeigen praktisch ein den chinesischen SIV-infizierten Versuchstieren identisches Expressionsverhalten von EAAT2.

Aufgrund der niedrigen Zahl an chinesischen Versuchstieren in der AIDS-Gruppe ist wie für den Nucleus Accumbens auch im Putamen kein Vergleich zwischen chinesischen und indischen AIDS-Tieren zu ziehen.

Insgesamt kann also auch für die Versuchstiere aus China und Indien im Putamen weder für EAAT1 noch für EAAT2 ein signifikanter Gruppenunterschied bezüglich des Herkunftslandes ermittelt werden.

(a)



(b)

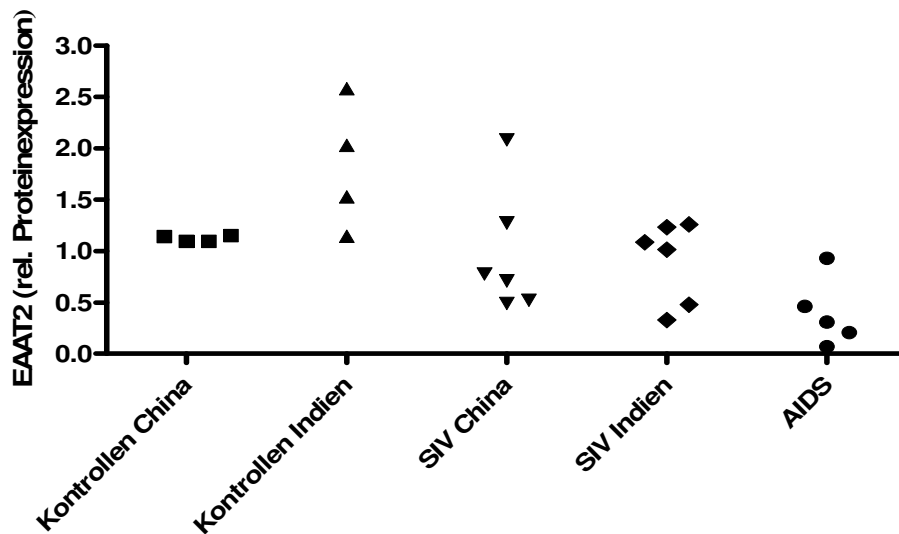


Abb. 32: Relative Proteinexpression von EAAT1 (a) und EAAT2 (b) im Putamen chinesischer und indischer Rhesusaffen.

Die Tiere werden in 5 Gruppen dargestellt: ■ uninfizierte/unbehandelte chinesische (Kontrollen China, n=4), ▲ uninfizierte/unbehandelte indische (Kontrollen Indien, n=4), ▼ SIV-infizierte/unbehandelte chinesische (SIV China, n=6), ◆ SIV-infizierte/unbehandelte indische (SIV Indien, n=6) und ● SIV-infizierte/unbehandelte an AIDS erkrankte (AIDS, $n_{\text{China}}=1$, $n_{\text{Indien}}=4$) Rhesusaffen.

3.3.1.4.2 *Relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens chinesischer und indischer Rhesusaffen*

Obwohl die relative Proteinexpression des EAAT1 im Nucleus Accumbens bei den indischen Kontrollen um über 40% erniedrigt ist im Vergleich zu den chinesischen Kontrollen, erreicht dieser Unterschied das Signifikanzniveau nicht.

Bei den SIV-infizierten Tieren findet sich ein dazu umgekehrtes Verhältnis: hier ist die EAAT1-Expression in den Gehirnen der chinesischen Affen um 23% weniger ausgeprägt als in den indischen Tieren.

Auch bezüglich der relativen Proteinexpression des EAAT2 kann eine Reduktion um knapp 30% der indischen Kontrolltiere im Vergleich zur chinesischen Kontrollgruppe beobachtet werden.

Bei den SIV-infizierten Tieren aus Indien ist eine Erniedrigung der EAAT2-Expression um weniger als 30% gegenüber den infizierten Versuchstieren aus China nachweisbar.

Da die AIDS-Gruppe nur ein chinesisches Tier enthält, ist ein Vergleich zwischen chinesischen und indischen an AIDS erkrankten Rhesusaffen nicht möglich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es bei den Versuchstieren im Nucleus Accumbens weder für EAAT1 noch für EAAT2 einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Versuchstiergruppen der beiden Herkunftsländer China und Indien gibt.

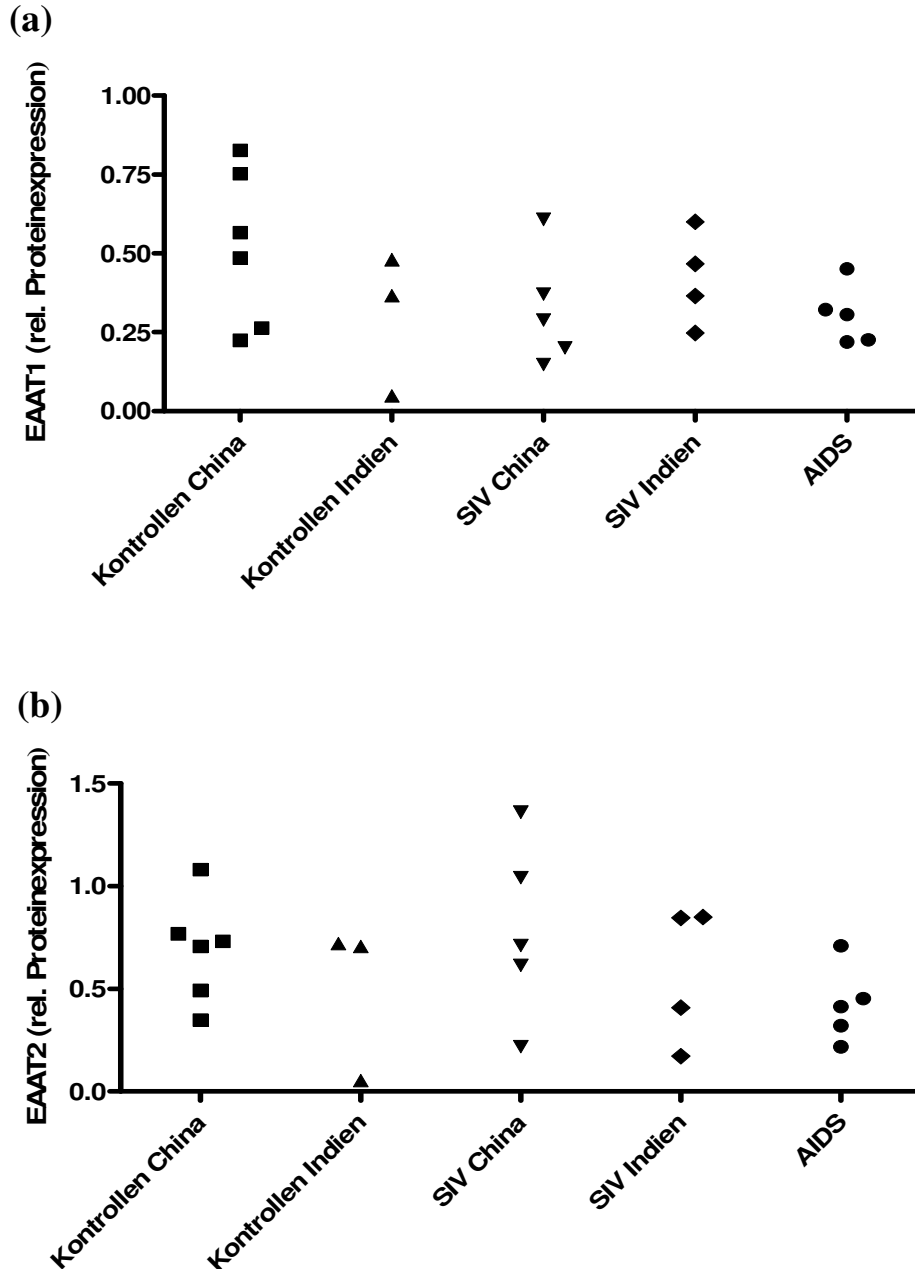


Abb. 33: Relative Proteinexpression von EAAT1 (a) und EAAT2 (b) im Nucleus Accumbens chinesischer und indischer Rhesusaffen.

Die Tiere werden in 5 Gruppen dargestellt: ■ uninfectierte/unbehandelte chinesische (Kontrollen China, n=6), ▲ uninfectierte/unbehandelte indische (Kontrollen Indien, n=3), ▼ SIV-infizierte/unbehandelte chinesische (SIV China, n=5), ◆ SIV-infizierte/unbehandelte indische (SIV Indien, n=4) und ● SIV-infizierte/unbehandelte an AIDS erkrankte (AIDS, n_{China}=1, n_{Indien}=4) Rhesusaffen.

3.3.2 Effekte verschiedener Pharmaka auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

Sämtliche für die verschiedenen pharmakologischen Behandlungen herangezogenen Rhesusaffen und deren Kontrollgruppen sind ausschließlich chinesischer Herkunft. Analog den für die Infektionsgruppierung durchgeführten Untersuchungen wurde die relative Proteinexpression der glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 mittels Western Blots bestimmt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte wieder über Balkendiagramme, in denen der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts veranschaulicht werden. Abbildungen repräsentativer Western Blots vervollständigen die Graphiken, in denen die Banden von EAAT1 bei 55 kDa, EAAT2 bei 65 kDa zu sehen sind.

3.3.2.1 Effekte von Memantin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

Das unten stehende Kapitel behandelt den Einfluss des NMDA-Antagonisten Memantin auf die Expression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2. Als Kontrollgruppen dienten uninfizierte sowie uninfizierte und mit dem MAO-B-Hemmer Selegilin behandelte Tiere. Neben der Gruppe aus SIV-infizierten und mit Memantin behandelten Rhesusaffen wurde zum Vergleich noch eine Gruppe bestehend aus SIV-infizierten und mit Selegilin behandelten Tieren eingeführt. Eine dritte Behandlungsgruppierung setzte sich aus SIV-infizierten Tieren zusammen, denen beide Substanzklassen verabreicht worden waren.

3.3.2.1.1 Effekte von Memantin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen

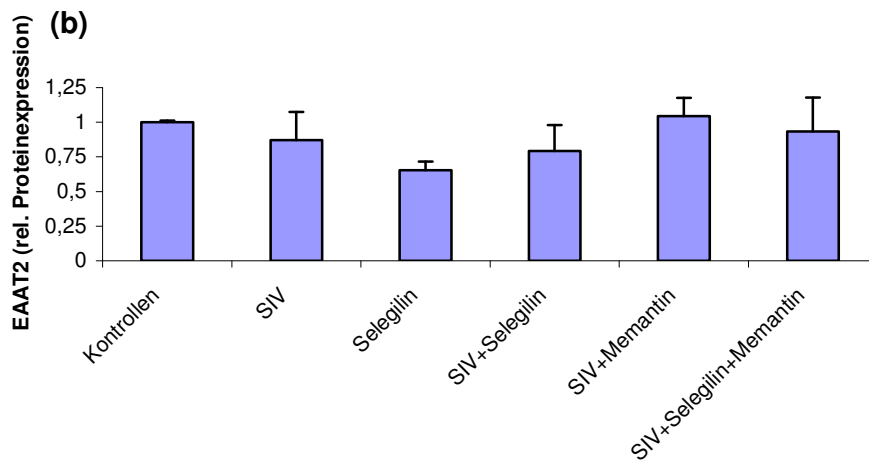
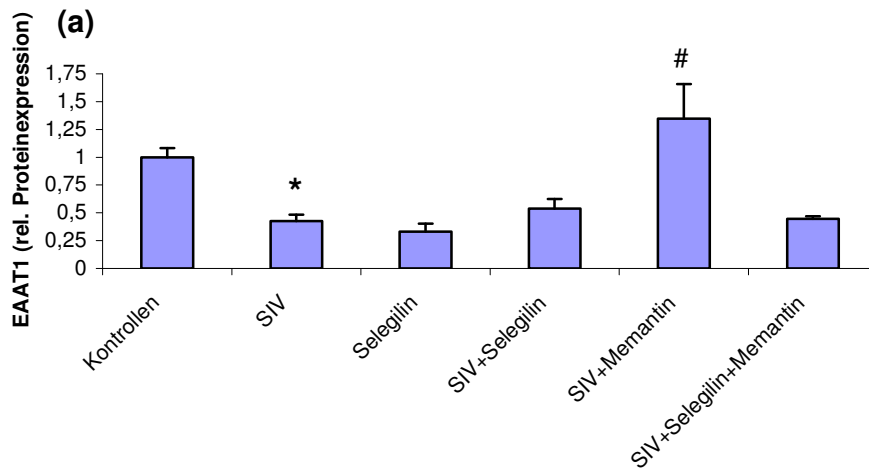
Wie unter 3.3.1.2.1 bereits näher erläutert, ist bei den SIV-infizierten unbehandelten Rhesusaffen ein signifikanter Abfall der Expression des EAAT1 um knapp 60% im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen zu verzeichnen. Deutlich reduziert im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen ist ebenfalls die Gruppe der uninfizierten mit Selegilin behandelten Kontrolltiere: mit einem Unterschied von fast 70% wurde nur knapp

das Signifikanzniveau verfehlt. Die infizierten mit Selegilin therapierten Affen exprimieren immerhin fast 40% mehr des EAAT1 im Putamen als die gesunden mit Selegilin behandelten Affen.

Im Gesamtbild fällt auf, dass sich mit einer Ausnahme alle Gruppen mit SIV-infizierten Affen auf ungefähr der gleichen niedrigen Höhe an EAAT1 bewegen: sie alle liegen zwischen ca. 50% und 70% unter dem Wert der unbehandelten uninfizierten Kontrollen. Nur bei den mit Memantin behandelten SIV-infizierten Tieren kann ein Anstieg des EAAT1 beobachtet werden, der sogar 35% über dem Wert der Kontrollen liegt. Signifikant wird dieser Anstieg allerdings nur im Vergleich zu den infizierten unbehandelten Rhesusaffen.

Der Vergleich der Kontrollen und der SIV-infizierten Tiere bezüglich der Expression des EAAT2 zeigt praktisch keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen (s. auch 3.3.1.2.1). Für die uninfizierten mit Selegilin behandelten Kontrolltiere wurde ein Absinken der EAAT2-Expression um 35% verglichen zu den unbehandelten Kontrolltieren ermittelt, das jedoch unter dem Signifikanzniveau lag. Obwohl sich bei den SIV-infizierten und mit Selegilin behandelten Tieren ein wenig mehr EAAT2 im Putamen nachweisen lässt, ist die Differenz zu den gesunden mit Selegilin therapierten Affen zu gering, um als relevant angesehen zu werden.

Vergleicht man die drei infizierten Behandlungsgruppierungen (SIV+Selegilin, SIV+Memantin und SIV+Selegilin+Memantin) untereinander, so ergibt sich ebenfalls ein relativ gleichmäßiges Expressionsverhalten bezüglich EAAT2, das sich auch nicht von der Proteinexpression der SIV-infizierten unbehandelten Tiere unterscheidet.



(c)

	Kontrollen	SIV	Selegilin	SIV +Selegilin	SIV +Memantin	SIV +Selegilin +Memantin
EAAT1						
EAAT2						

Abb. 34: Relative Proteinexpression von EAAT1 (a) und EAAT2 (b) im Putamen chinesischer Rhesusaffen.

Die Tiere wurden in 5 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=4), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=6), uninfizierte/mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=3), SIV-infizierte/mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=6), SIV-infizierte/mit Memantin behandelte (SIV+Memantin, n=4) und SIV-infizierte sowohl mit Selegilin als auch mit Memantin behandelte (SIV+Selegilin+Memantin, n=3) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen. #: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu SIV (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

(c) Repräsentative Westernblots von EAAT1 und EAAT2 aus der Gruppe der Kontrollen sowie der SIV-, Selegilin-, SIV+Selegilin-, SIV+Memantin- und SIV+Selegilin+Memantin-Gruppe.

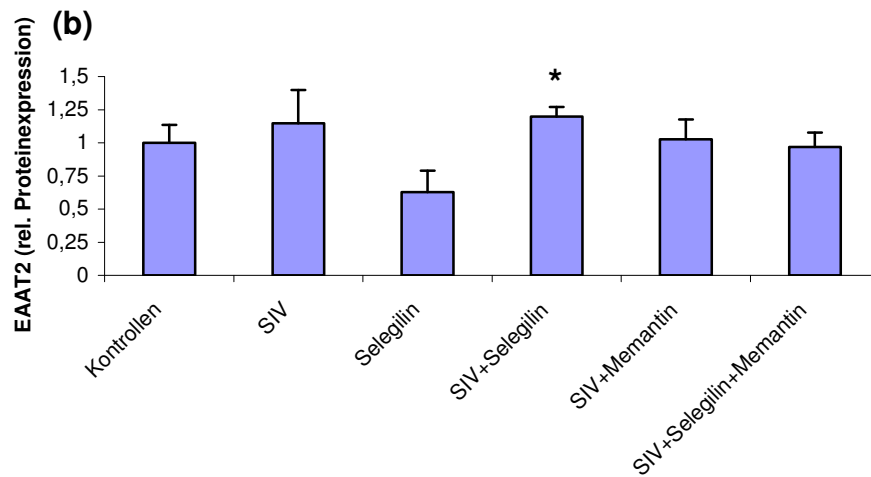
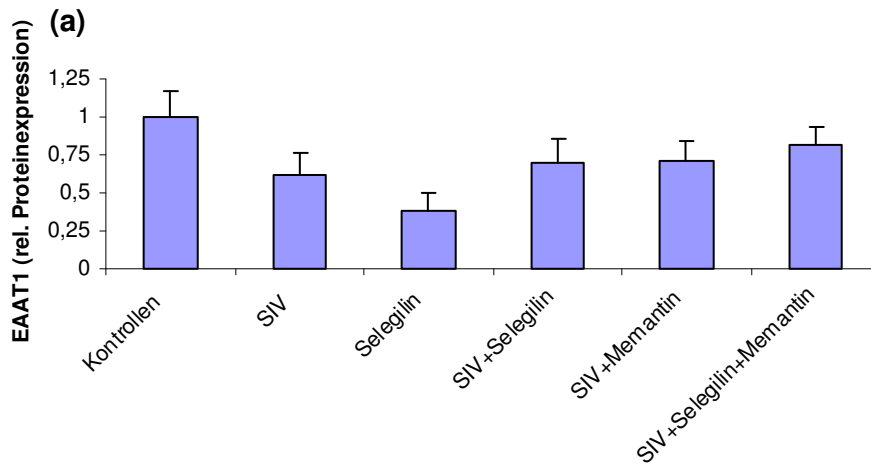
3.3.2.1.2 Effekte von Memantin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens SIV-infizierter Rhesusaffen

Wie zuvor in 3.3.1.2.2 beschrieben ergab sich eine ca. 40%ige, nicht signifikante Reduktion der Expression des EAAT1 der SIV-infizierten, aber asymptomatischen Makakken im Vergleich zu den uninfizierten Kontrolltieren. Noch deutlicher fiel der Vergleich der Kontrolltiere zu den ebenfalls uninfizierten, aber mit Selegilin behandelten Kontrolltieren aus: bei letzteren war die Expression von EAAT1 um ca. 60% reduziert. Die nicht infizierten mit Selegilin therapierten Affen produzierten 45% weniger EAAT1 als die infizierten mit Selegilin behandelten Rhesusaffen.

Alle behandelten SIV-infizierten Tiere zeigten eine etwas höhere Expression von EAAT1 als die Gruppe der mit SIV-infizierten unbehandelten Affen, die aber nie an das Expressionsniveau der Kontrolltiere heranreichte. Die Behandlung mit Selegilin bzw. mit Memantin ergab fast exakt die gleiche Proteinexpression und lag nur ca. 10% über dem Niveau der SIV-infizierten Tiere ohne Therapie. Die mit beiden Substanzen behandelten Affen erreichten immerhin eine 25% höhere Expression an EAAT1 als die Gruppe der unbehandelten Infizierten.

Für EAAT2 konnte eine Zunahme der Proteinexpression um ca. 13% der SIV-infizierten im Vergleich zu den uninfizierten Kontrolltieren festgestellt werden (s. auch 3.3.1.2.2). Die uninfizierten mit Selegilin behandelten Kontrolltiere exprimierten fast 40% weniger EAAT2 als die unbehandelten Kontrollen ohne das Signifikanzniveau zu überschreiten. Dagegen lag der Wert der uninfizierten mit Selegilin therapierten Affen signifikant um 47% unter dem der ebenfalls mit Selegilin behandelten, aber infizierten Affen.

Die drei SIV-infizierten Behandlungsgruppen unterschieden sich weder untereinander noch im Vergleich zur Gruppe mit den unbehandelten SIV-infizierten Tieren signifikant.



(c)

	Kontrollen	SIV	Selegilin	SIV +Selegilin	SIV +Memantin	SIV +Selegilin +Memantin
EAAT1						
EAAT2						

Abb. 35: Relative Proteinexpression von EAAT1 **(a)** und EAAT2 **(b)** im Nucleus Accumbens chinesischer Rhesusaffen.

Die Tiere wurden in 5 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=6), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=5), uninfizierte/mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=3), SIV-infizierte/mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=6), SIV-infizierte/mit Memantin behandelte (SIV+Memantin, n=4) und SIV-infizierte sowohl mit Selegilin als auch mit Memantin behandelte (SIV+Selegilin+Memantin, n=4) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M. ., *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu Selegilin (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

(c) Repräsentative Westernblots von EAAT1 und EAAT2 aus der Gruppe der Kontrollen sowie der SIV-, Selegilin-, SIV+Selegilin-, SIV+Memantin- und SIV+Selegilin+Memantin-Gruppe.

3.3.2.2 Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

Untenstehend wird auf die Effekte der beiden Antioxidantien NAC sowie Melatonin auf die Expression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 eingegangen. Als Kontrollgruppen dienten uninfizierte sowie uninfizierte und mit dem Antiparkinsonmittel Selegilin behandelte Tiere. Neben der Gruppe aus SIV-infizierten und mit beiden Antioxidantien behandelten Rhesusaffen wurde zusätzlich eine Gruppe aus SIV-infizierten und mit Selegilin behandelten Tieren analysiert. Eine dritte Behandlungsgruppe setzte sich aus SIV-infizierten Tieren zusammen, die mit NAC und Melatonin sowie Selegilin therapiert worden waren.

3.3.2.2.1 Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen

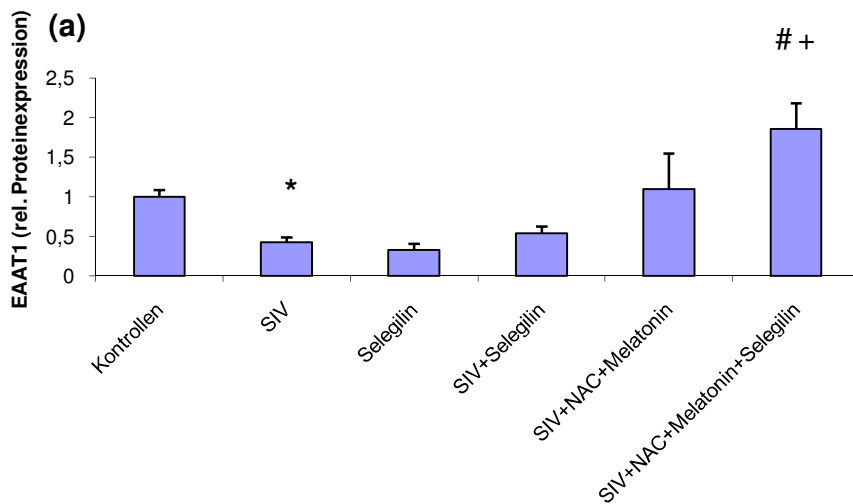
Schon in 3.3.1.2.1 und in 3.3.2.1.1 wurde beschrieben, dass die Expression des EAAT1 signifikant um knapp 60% bei den SIV-infizierten unbehandelten Versuchstieren im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen abfällt. Die uninfizierten mit Selegilin behandelten Kontrolltiere zeigen im Vergleich zu den unbehandelten gesunden Kontrollen eine noch deutlichere Reduktion der Proteinexpression um etwa 70%. Auch die EAAT1-Expression der SIV-infizierten und mit Selegilin behandelten Rhesusaffen liegt fast 40% über derjenigen der uninfizierten mit Selegilin therapierten Kontrolltiere.

Sehr eindrucksvoll war die Steigerung der Proteinexpression des EAAT1 bei den mit den beiden Antioxidantien NAC und Melatonin behandelten Affen: ihr Wert übersteigt den der SIV-infizierten unbehandelten Affen um über 60%. Die Kombinationsbehandlung mit den beiden Antioxidantien sowie Selegilin erbrachte jedoch die mit Abstand höchste Expression des EAAT1 im Putamen von Rhesusaffen: im Vergleich zu den SIV-infizierten unbehandelten Affen war eine Steigerung um mehr als den Faktor 4 zu verzeichnen und erreichte damit Signifikanzniveau. Als signifikant erwies sich diese Erhöhung ebenfalls im Vergleich mit den SIV-infizierten und mit Selegilin behandelten Tieren.

Auch für EAAT2 ist bereits aus 3.3.1.2.1 und 3.3.2.1.1 bekannt, dass zwischen den unbehandelten gesunden Kontrollen und den unbehandelten Infizierten kein relevanter

Unterschied in der Proteinexpression auszumachen ist. Die mit Selegilin behandelten uninfizierten Kontrolltiere exprimierten 35% weniger EAAT2 als die unbehandelten nicht infizierten Kontrollen. Weiterhin wurde klar, dass trotz einer leichten Erhöhung der EAAT2-Expression der SIV-infizierten mit Selegilin behandelten Rhesusaffen gegenüber den uninfizierten mit Selegilin behandelten Tieren kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht (s. auch 3.3.2.1.1).

Wie für EAAT1 ist auch bei EAAT2 zu beobachten, dass die SIV-infizierten und mit Selegilin behandelten Tiere sich nur unmerklich von den SIV-infizierten unbehandelten Affen unterscheiden. Die mit den beiden Antioxidantien NAC und Melatonin behandelte Gruppe liegt jedoch genau wie bei der Analyse des EAAT1 mit etwa 30% höherer EAAT2-Expression deutlich über derjenigen der SIV-infizierten unbehandelten Affen. Wieder analog zur Situation bei EAAT1 ergab die Behandlung mit Selegilin und den beiden Antioxidantien die höchste Expression von EAAT2 im Putamen von Rhesusaffen: sie übersteigt um ca. 40% die EAAT2-Expression der SIV-infizierten unbehandelten Tiere.



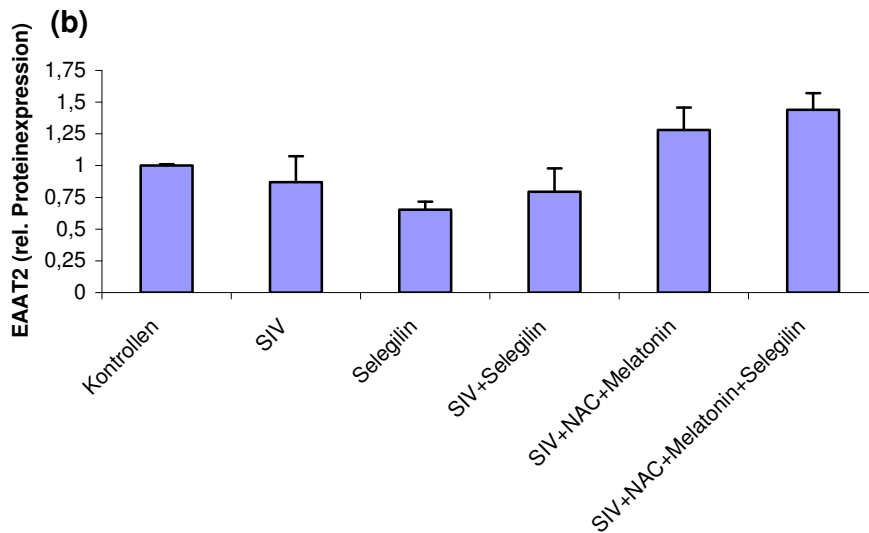


Abb. 36: Relative Proteinexpression von EAAT1 (a) und EAAT2 (b) im Putamen chinesischer Rhesusaffen.

Die Tiere wurden in 5 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=4), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=6), uninfizierte/mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=3), SIV-infizierte/mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=6), SIV-infizierte mit NAC und Melatonin behandelte (SIV+NAC+Melatonin, n=3) und SIV-infizierte mit NAC, Melatonin und Selegilin behandelte (SIV+NAC+Melatonin+Selegilin, n=3) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen; #: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu SIV; +: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu SIV+Selegilin (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

(c) Repräsentative Westernblots von EAAT1 und EAAT2 aus der Gruppe der Kontrollen sowie der SIV-, Selegilin-, SIV+Selegilin-, SIV+NAC+Melatonin- und SIV+NAC+Melatonin+Selegilin-Gruppe.

3.3.2.2.2 Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die relative Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 im Nucleus Accumbens SIV-infizierter Rhesusaffen

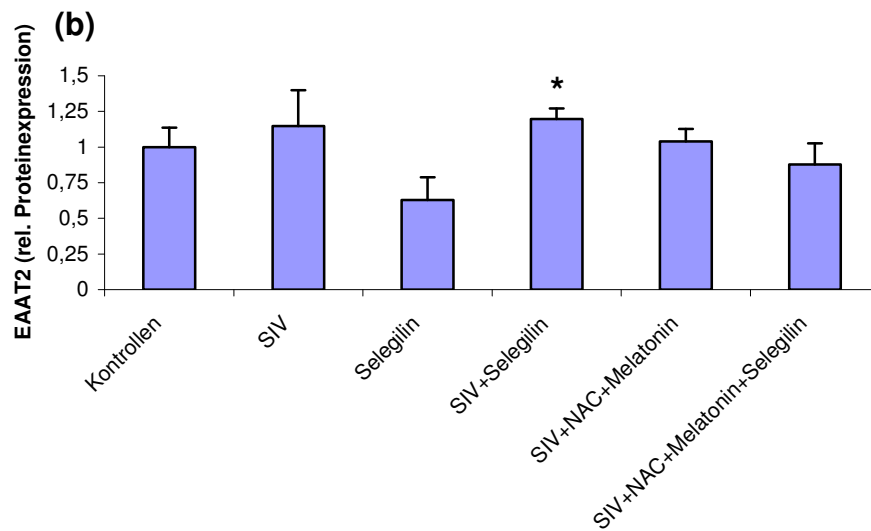
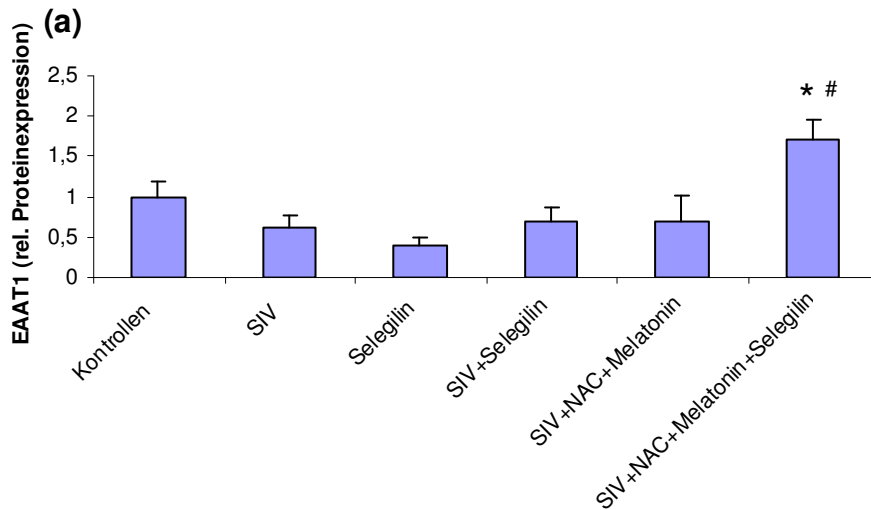
Wie bereits in 3.3.1.2.2 und 3.3.2.1.2 dargestellt, konnte eine 40%ige nicht signifikante Reduktion der Proteinexpression des EAAT1 der SIV-infizierten unbehandelten im Vergleich zu den uninfizierten Kontrolltieren analysiert werden. Auch die Reduktion der Expression des EAAT1 um über 60% der mit Selegilin behandelten uninfizierten Tiere im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen findet sich in untenstehender Abb.

37 (a) wieder. Die 45%ige Erniedrigung des EAAT1 im Nucleus Accumbens der infizierten und mit Selegilin behandelten Tiere im Vergleich zu den Affen, die gesund waren und denen nur Selegilin verabreicht worden war, ist ebenfalls schon aus 3.3.2.1.2 bekannt.

Die infizierten und mit Selegilin therapierten Tiere zeigten fast exakt denselben Wert wie die infizierten und mit NAC und Melatonin therapierten Affen. Damit waren diese beiden Behandlungsgruppierungen auch vergleichbar mit der Gruppe der unbehandelten SIV-infizierten Rhesusaffen, deren Proteinexpression von EAAT1 nur 10% unter ihnen ermittelt werden konnte. Wirklich auffällig stellte sich die Erhöhung der EAAT1-Expression in der Gruppe der Affen dar, die mit den beiden Antioxidantien NAC und Melatonin sowie Selegilin behandelt worden waren: im Vergleich zu den SIV-infizierten unbehandelten Rhesusaffen stieg die Proteinexpression fast um den Faktor 3 und war damit hochsignifikant. Im Vergleich zu den nur mit Selegilin behandelten infizierten Affen ergab sich für die Gruppe mit der dreifachen Behandlung ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Expression des EAAT1 um mehr als das Doppelte.

Auch für EAAT2 wurde in Abschnitt 3.3.1.2.2 und 3.3.2.1.2 bereits folgende Erkenntnisse gewonnen: zwischen den SIV-infizierten im Vergleich zu den uninfizierten Kontrolltieren bestand praktisch kein relevanter Unterschied bezüglich der Expression des EAAT2. Bei den mit Selegilin therapierten Kontrollen findet sich eine um 40% geringere Proteinexpression des EAAT2 als bei den unbehandelten Kontrollen. Die infizierten mit Selegilin behandelten Affen exprimierten knapp 50% mehr EAAT2 im Nucleus Accumbens als die uninfizierten mit Selegilin behandelten Affen.

Alle drei Gruppen von SIV-infizierten Affen mit den verschiedenen Behandlungsbedingungen unterschieden sich nicht wesentlich von den unbehandelten SIV-infizierten Tieren. Auch zwischen diesen drei Behandlungsgruppierungen kann man nur leichte Schwankungen feststellen. Insgesamt entspricht dieses Bild nicht so sehr dem für EAAT1, sondern viel mehr dem für EAAT2 in der Versuchsbedingung „Behandlung mit Memantin und Selegilin“ unter 3.3.2.1.2.



(c)

	Kontrollen	SIV	Selegilin	SIV +Selegilin	SIV +NAC +Melatonin	SIV +NAC +Melatonin +Selegilin
EAAT1						
EAAT2						

Abb. 37: Relative Proteinexpression von EAAT1 (a) und EAAT2 (b) im Nucleus Accumbens chinesischer Rhesusaffen.

Die Tiere wurden in 5 Gruppen eingeteilt: uninferzierte/unbehandelte (Kontrollen, n=6), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=5), uninferzierte/mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=3), SIV-infizierte/mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=6), SIV-infizierte mit NAC und Melatonin behandelte (SIV+NAC+Melatonin, n=3) und SIV-infizierte mit NAC, Melatonin und Selegilin behandelte (SIV+NAC+Melatonin+Selegilin, n=3) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., (a): *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu SIV. #: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu SIV+Selegilin; (b): *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu Selegilin (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

(c) Repräsentative Westernblots von EAAT1 und EAAT2 aus der Gruppe der Kontrollen sowie der SIV-, Selegilin-, SIV+Selegilin-, SIV+NAC+Melatonin- und SIV+NAC+Melatonin+Selegilin-Gruppe.

3.4 Protein- und Genexpression des TNF- α im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

Die Proteinexpression des TNF- α im Nucleus Accumbens wurde mittels ELISA-Verfahren, die relative Genexpression von TNF- α im Putamen durch die Real-Time-PCR bestimmt.

Im Folgenden werden sowohl die Ergebnisse für die unbehandelten, SIV-infizierten Rhesusaffen (3.4.1), als auch für die SIV-infizierten Rhesusaffen mit unterschiedlicher pharmakologischer Behandlung (3.4.2) beschrieben.

Der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) wurden für die jeweiligen Untergruppen in Balkendiagrammen dargestellt. Dabei wurde aus Gründen der Vereinfachung und besseren Vergleichbarkeit die Proteinexpression bzw. die relative Genexpression der uninfizierten chinesischen Kontrolltiere gleich 1 gesetzt.

3.4.1 Protein- und Genexpression des TNF- α im Gehirn unbehandelter, SIV-infizierter Rhesusaffen

Die ausschließliche Wirkung der SIV-Infektion ohne zusätzliche pharmakologische Therapie auf die Proteinexpression des TNF- α im Nucleus Accumbens und auf die relative Genexpression im Putamen wurde durch den Vergleich von nicht-infizierten Kontrolltieren mit SIV-infizierten sowie an AIDS erkrankten Rhesusaffen ermittelt. Wie bei der Infektionsgruppierung für die weiter vorne beschriebenen Experimente (3.3.1) zeigten die hier verwendeten SIV-infizierten Tiere ebenfalls noch keine klinischen Zeichen der Erkrankung. Bei den AIDS-Tieren handelt es sich wieder um vorwiegend indische Tiere mit ersten klinischen Anzeichen von AIDS sowie hoher Viruslast.

3.4.1.1 Relative Genexpression des TNF- α im Putamen unbehandelter, SIV-infizierter Rhesusaffen

Wie auf untenstehender Abb. 38 verdeutlicht, steigt die relative Genexpression des TNF- α auf der Ebene der mRNA im Putamen mit fortschreitendem Infektionsverlauf

an. So wurde die TNF- α -mRNA in den SIV-infizierten chinesischen Versuchstieren signifikant um über den Faktor 2 stärker exprimiert als in den Kontrollen aus China. Auch beim Vergleich der indischen Rhesusaffen zeigt sich, dass die relative Genexpression der SIV-infizierten Affen deutlich über derjenigen der Kontrollen lag, wobei allerdings kein Signifikanzniveau erreicht wurde. Die stärkste Genexpression ist bei der Gruppe der AIDS-Tiere zu verzeichnen: im Vergleich zu den indischen SIV-infizierten Rhesusaffen kann ein Anstieg von fast 35% beobachtet werden, im Vergleich zu den Kontrolltieren aus Indien ergibt sich sogar eine signifikante Erhöhung um mehr als den Faktor 2.

Bei einem Vergleich der Ursprungsländer der Makakken fällt auf, dass die indischen Kontrolltiere eine doppelt so hohe relative Genexpression aufweisen wie die chinesischen Kontrollen. Auch die indischen SIV-infizierten Rhesusaffen exprimieren auf genetischer Ebene höhere Werte an TNF- α als die chinesischen SIV-infizierten Affen: der Unterschied von etwas über 25% fiel dabei aber relativ gering aus.

Aufgrund der niedrigen Zahl an chinesischen Versuchstieren in der AIDS-Gruppe kann wie für den Nucleus Accumbens auch im Putamen kein Vergleich zwischen chinesischen und indischen AIDS-Tieren gezogen werden.

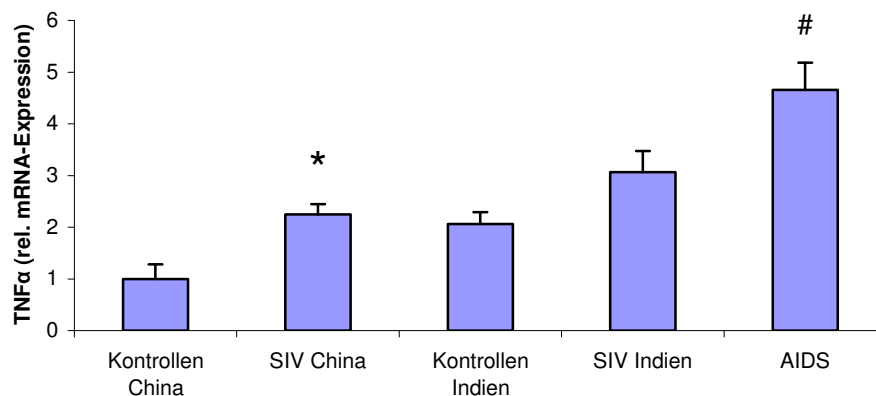


Abb. 38: Relative mRNA-Expression des TNF- α im Putamen chinesischer und indischer Rhesusaffen. Die Tiere wurden in 5 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte chinesische (Kontrollen China, n=5), SIV-infizierte/unbehandelte chinesische (SIV China, n=5), uninfizierte/unbehandelte indische (Kontrollen Indien, n=4), SIV-infizierte/unbehandelte indische (SIV Indien, n=7) und SIV-infizierte/unbehandelte an AIDS erkrankte (AIDS, n=5, n_{China}=1, n_{Indien}=4) Rhesusaffen. Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen China; #: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen Indien (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

3.4.1.2 Proteinoxpression des TNF- α im Nucleus Accumbens unbehanelter, SIV-infizierter Rhesusaffen

Die Infektion mit SIV führte bei den chinesischen Tieren im Nucleus Accumbens zu keiner wesentlichen Veränderung der Proteinoxpression des TNF- α : die infizierten Affen wiesen nur einen geringfügig niedrigeren Wert als die uninfizierten Kontrollen auf. Durch die Infektion steigt die Proteinoxpression bei den Affen der indischen SIV-Gruppe im Vergleich zu den indischen Kontrolltieren um beinahe den Faktor 2,5 an, wobei aber keine statistische Signifikanz erreicht wird.

Ein Vergleich der AIDS-Gruppe mit den chinesischen Tieren verbietet sich aufgrund der geringen Anzahl chinesischer Tiere in der AIDS-Gruppe.

Vergleicht man die Tiere nach ihrem Herkunftsland, so kann im Nucleus Accumbens für die indischen Kontrollen eine gegenüber den chinesischen Kontrollen nur geringfügig niedrigere Proteinoxpression von TNF- α festgestellt werden. Bei den SIV-infizierten indischen Rhesusaffen hingegen ist eine signifikante Erhöhung ihrer TNF- α -Expression im Vergleich zu den SIV-infizierten chinesischen Affen um das Doppelte festzustellen.

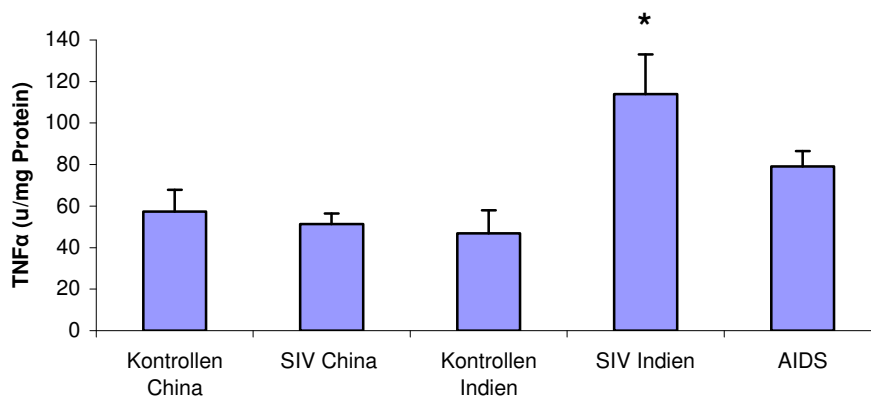


Abb. 39: Proteinoxpression des TNF- α im Nucleus Accumbens chinesischer und indischer Rhesusaffen. Die Tiere wurden in 5 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte chinesische (Kontrollen China, n=6), SIV-infizierte/unbehandelte chinesische (SIV China, n=5), uninfizierte/unbehandelte indische (Kontrollen Indien, n=3), SIV-infizierte/unbehandelte indische (SIV Indien, n=4) und SIV-infizierte/unbehandelte an AIDS erkrankte (AIDS, n=6, n_{China}=1, n_{Indien}=5) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu SIV China (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

3.4.2 Effekte verschiedener Pharmaka auf die Protein- und Genexpression des TNF- α im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

Wie bereits bei der Bestimmung der Auswirkungen der verschiedenen Pharmaka auf die relative Proteinexpression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 (3.3.2) gilt auch hier, dass die herangezogenen Rhesusaffen und deren Kontrollgruppen ausschließlich chinesischer Herkunft waren. Analog den für die Infektionsgruppierung durchgeführten Untersuchungen wurde die Proteinexpression des TNF- α mittels ELISA, die relative Genexpression mittels Real-Time-PCR bestimmt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte wieder über Balkendiagramme, in denen der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts veranschaulicht werden.

3.4.2.1 Effekte von Memantin und Selegilin auf die Protein- und Genexpression des TNF- α im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

Im Folgenden wird die Auswirkung des NMDA-Antagonisten Memantin und des Antiparkinsonmittels Selegilin auf die Expression des TNF- α analysiert. Als Kontrollen dienten sowohl uninfizierte als auch uninfizierte und mit Selegilin behandelte Rhesusaffen. Einer Gruppe von SIV-infizierten Affen wurde nur Memantin, einer zweiten nur Selegilin und einer dritten beide Substanzklassen gegeben.

3.4.2.1.1 Effekte von Memantin und Selegilin auf die relative Genexpression des TNF- α im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen

Die unten abgebildete Genexpressionsanalyse zeigt einen signifikanten Anstieg um den Faktor 2,3 des TNF- α im Putamen der SIV-infizierten unbehandelten Rhesusaffen im Vergleich zu den nicht infizierten unbehandelten Kontrolltieren.

Verglichen mit den uninfizierten unbehandelten Kontrolltieren lässt sich auch bei den uninfizierten mit Selegilin behandelten Tieren eine um 30% höhere TNF- α -mRNA-Expression feststellen, die aber nicht signifikant wurde. Dagegen ist eine signifikante Zunahme der relativen Expression von TNF- α in der Gruppe der infizierten mit Selegilin therapierten Rhesusaffen im Vergleich zu den uninfizierten mit Selegilin behandelten Versuchstieren festzustellen. Diese Abweichung beträgt 32%.

Die drei Behandlungsgruppierungen – bestehend aus SIV-infizierten Affen, denen Selegilin oder Memantin oder Selegilin und Memantin verabreicht worden war – bewegten

sich hinsichtlich TNF- α relativ konstant auf demselben Genexpressionsniveau. Keine dieser drei Gruppen wich wesentlich von der relativen Genexpression der SIV-infizierten unbehandelten Affen ab.

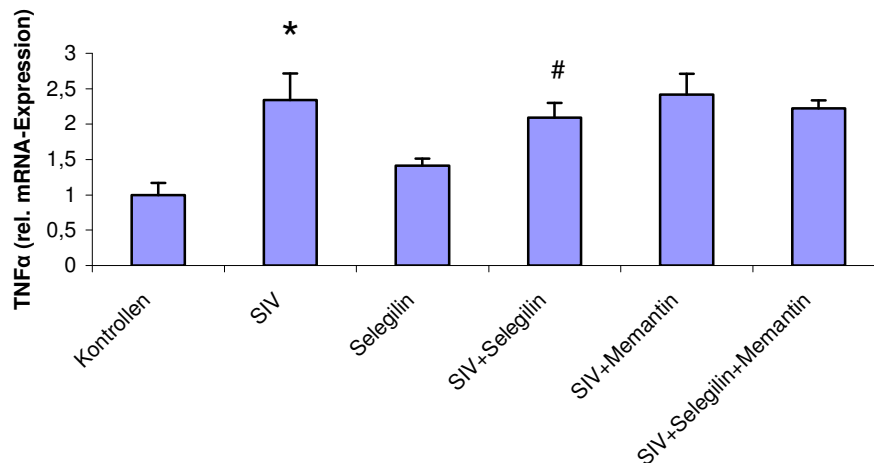


Abb. 40: Relative mRNA-Expression des TNF- α im Putamen chinesischer Rhesusaffen.

Die Tiere wurden in 6 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=5), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=5), uninfizierte/mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=5), SIV-infizierte/mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=8), SIV-infizierte/mit Memantin behandelte (SIV+Memantin, n=4) und SIV-infizierte sowohl mit Selegilin als auch mit Memantin behandelte (SIV+Selegilin+Memantin, n=4) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen; #: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu Selegilin (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

3.4.2.1.2 *Effekte von Memantin und Selegilin auf die Proteinexpression des TNF- α im Nucleus Accumbens SIV-infizierter Rhesusaffen*

Wie schon unter 3.4.1.2 beschrieben, besteht zwischen den uninfizierten unbehandelten Kontrollen und den unbehandelten SIV-infizierten Tieren kein relevanter Unterschied in der Proteinexpression des TNF- α . Genauso wenig unterscheiden sich die Kontrollen von den uninfizierten, nur mit Selegilin therapierten Rhesusaffen. Auch die Infektion bewirkte in den mit Selegilin behandelten Makakken keinen erwähnenswerten Anstieg der TNF- α -Expression im Nucleus Accumbens im Vergleich zu den uninfizierten mit Selegilin behandelten Tieren.

Während sich also alle unbehandelten und uninfizierten, aber auch die SIV-infizierten und mit Selegilin behandelten Rhesusaffen auf gleicher Ebene um die 60 u/mg TNF- α

bewegten, so zeigten die beiden restlichen Behandlungsgruppen SIV-infizierter Versuchstiere diesbezüglich erhöhte, aber nicht signifikante Werte. Demnach lag die Proteinexpression der SIV-infizierten und mit Memantin behandelten Affen ca. 35% über derjenigen der SIV-infizierten unbehandelten Rhesusaffen. Der Gruppe der SIV-infizierten Tiere, denen Selegilin und Memantin verabreicht worden war, konnte im Vergleich mit den infizierten unbehandelten Affen eine um 30% gesteigerte Proteinexpression von TNF- α nachgewiesen werden.

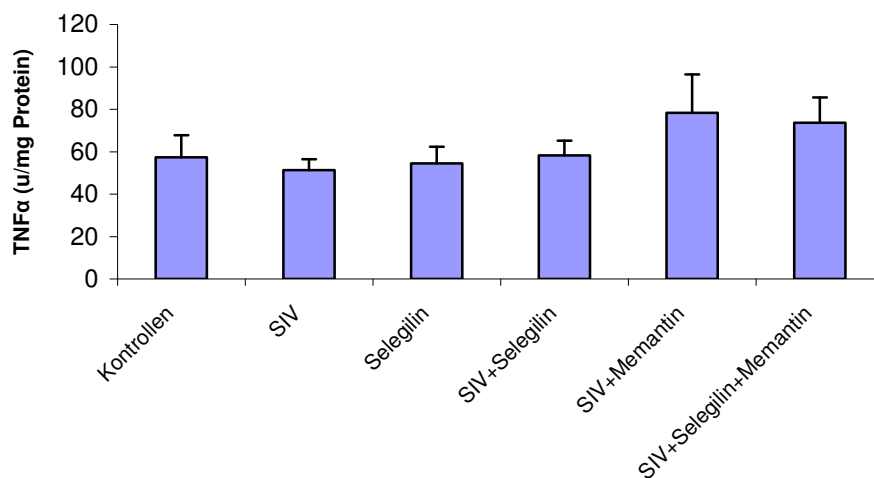


Abb. 41: Proteinexpression des TNF- α im Nucleus Accumbens chinesischer Rhesusaffen. Die Tiere wurden in 6 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=6), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=5), uninfizierte/mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=3), SIV-infizierte/mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=6), SIV-infizierte/mit Memantin behandelte (SIV+Memantin, n=4) und SIV-infizierte sowohl mit Selegilin als auch mit Memantin behandelte (SIV+Selegilin+Memantin, n=4) Rhesusaffen. Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M..

3.4.2.2 Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die Protein- und Genexpression des TNF- α im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

Die Auswirkungen der Antioxidantien NAC sowie Melatonin auf die Expression des TNF- α werden im nachstehenden Kapitel dargestellt. Als Kontrollen dienten sowohl uninfizierte als auch uninfizierte und mit Selegilin behandelte Rhesusaffen. Einem Teil der SIV-infizierten Affen wurde nur Selegilin, einem zweiten NAC und Melatonin und einem dritten alle drei Substanzklassen zugeführt.

3.4.2.2.1 Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die relative Genexpression des TNF- α im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen

Analog zu den Untersuchungen bezüglich der Wirkung der Substanzen Memantin und Selegilin auf die relative Genexpression von TNF- α im Putamen (s. 3.4.2.1.1) konnte auch hier wieder eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression des TNF- α der SIV-infizierten unbehandelten Tiere im Vergleich zu den uninfizierten Kontrolltieren ermittelt werden. Der Anstieg belief sich auf 45%. In den mit Selegilin behandelten, aber nicht infizierten Kontrolltieren trat eine im Vergleich mit den unbehandelten uninfizierten Kontrollen um fast 25% höhere relative Genexpression hinsichtlich TNF- α auf. Gegenüber den uninfizierten mit Selegilin therapierten Rhesusaffen zeigte sich bei den SIV-infizierten mit Selegilin behandelten Affen eine signifikante Steigerung der TNF- α -mRNA-Expression um 30%.

Die SIV-infizierten und mit Selegilin oder mit den Antioxidantien NAC und Melatonin oder mit Selegilin, NAC und Melatonin behandelten Affen bewegten sich hinsichtlich ihrer TNF- α -mRNA-Expression auf gleicher Ebene. Verglichen mit den SIV-infizierten unbehandelten Rhesusaffen konnte ebenfalls kein relevanter Unterschied in der relativen Genexpression festgestellt werden.

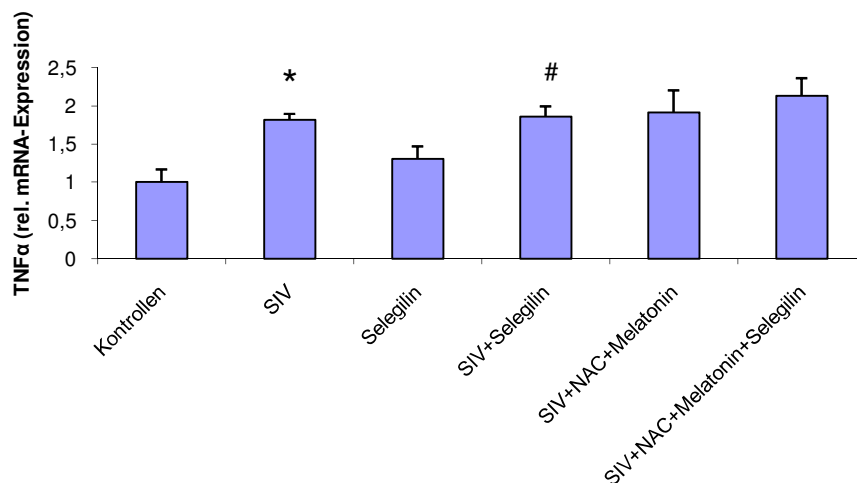


Abb. 42: Relative mRNA-Expression des TNF- α im Putamen chinesischer Rhesusaffen.

Die Tiere wurden in 6 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=5), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=5), uninfizierte/mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=5), SIV-infizierte/mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=9), SIV-infizierte mit NAC und Melatonin behandelte (SIV+NAC+Melatonin, n=3) und SIV-infizierte mit NAC, Melatonin und Selegilin behandelte (SIV+NAC+Melatonin+Selegilin, n=3) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen; #: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu Selegilin (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

3.4.2.2.2 Effekte von NAC, Melatonin und Selegilin auf die Proteinexpression von TNF- α im Nucleus Accumbens SIV-infizierter Rhesusaffen

Bereits in 3.4.1.2 und 3.4.2.1.2 ergab die Analyse des Expressionsverhaltens des TNF- α , dass zwischen den uninfizierten unbehandelten Kontrollen und den SIV-infizierten unbehandelten Makakken keine bemerkenswerte Differenz zu ermitteln ist. Weiterhin wurde in 3.4.2.1.2 festgestellt, dass sich die uninfizierten unbehandelten Kontrollen auch nicht von den uninfizierten mit Selegilin behandelten Affen unterscheiden. Für die SIV-infizierten mit Selegilin therapierten Rhesusaffen konnte im Vergleich zu den uninfizierten mit Selegilin behandelten Tieren ebenfalls kein Unterschied beobachtet werden.

Ähnlich zum Gesamtbild der Untersuchungen zur Behandlung mit Memantin und Selegilin (3.4.2.1.2) zeigte sich auch hier ein Anstieg der Proteinexpression von TNF- α in den beiden letzten Behandlungsgruppen: die mit den Antioxidantien NAC und Melatonin behandelten SIV-infizierten Tiere exprimieren TNF- α um 38% stärker als die Gruppe der SIV-infizierten unbehandelten Affen. Der Anstieg der TNF- α -Expression bei den SIV-infizierten mit den beiden Antioxidantien und Selegilin behandelten Tieren im Vergleich zu den SIV-infizierten Unbehandelten ist sogar signifikant um beinahe den Faktor 2,5 erhöht.

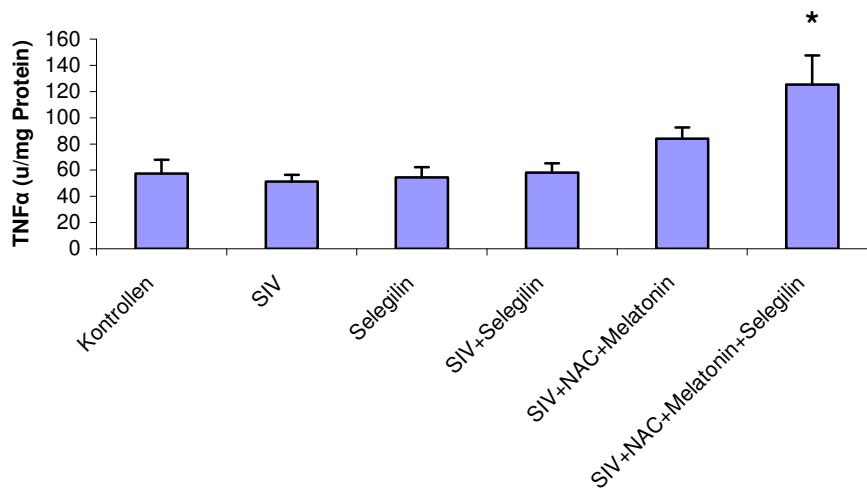


Abb. 43: Proteinexpression des TNF- α im Nucleus Accumbens chinesischer Rhesusaffen. Die Tiere wurden in 6 Gruppen eingeteilt: uninfizierte/unbehandelte (Kontrollen, n=6), SIV-infizierte/unbehandelte (SIV, n=5), uninfizierte/mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=3), SIV-infizierte/mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=6), SIV-infizierte mit NAC und Melatonin behandelte (SIV+NAC+Melatonin, n=3) und SIV-infizierte mit NAC, Melatonin und Selegilin behandelte (SIV+NAC+Melatonin+Selegilin, n=3) Rhesusaffen.

Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., *: $p \leq 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu SIV (zweiseitiger, non-parametrischer Mann-Whitney-U-Test).

4. Diskussion

4.1 *EAAT1 und EAAT2*

4.1.1 **EAAT1 und EAAT2 im Verlauf der SIV-Infektion**

Mit Hilfe des zuverlässigsten Tiermodells der HIV-Infektion – dem SIV/Rhesusaffenmodell – wurde die Rolle des Neurotransmitters Glutamat in der Pathophysiologie der virusbedingten dementiellen Symptomatik untersucht. Es gibt Hinweise, dass sich die HIV-induzierte Neurodegeneration aus einem Prozess der Exzitotoxizität ergibt, da Antagonisten der exzitatorischen Rezeptoren diesen Effekt blockieren (Lipton, 1994). In einer anderen Studie wurden erhöhte Glutamatspiegel in der Zerebrospinalflüssigkeit von SIV-infizierten Rhesusaffen gefunden, die auf eine gesteigerte Glutamatsynthese in Makrophagen und Mikroglia zurückgeführt werden konnten (Koutsilieri et al., 1999). Da die Zerebrospinalflüssigkeit den extrazellulären Pool der Neurotransmitter repräsentiert, deuteten diese Ergebnisse indirekt an, dass Glutamat im Extrazellulärraum während der SIV Infektion erhöht war und möglicherweise die Exzitotoxizität ausgelöst haben könnte, bis durch Anpassungsmechanismen der Glutamatabtransport in den glutamatergen Synapsen des Gehirns gesteigert wurde. Dieser Glutamatabtransport findet im menschlichen Gehirn durch hochaffine natriumabhängige glutamaterge Transporter – die sog. exzitatorischen Aminosäuretransporter 1 und 2 (EAAT1 und EAAT2) – statt. Sie beenden damit nicht nur die normale exzitatorische Neurotransmission durch Glutamat, sondern sind hauptverantwortlich für die Verhinderung zu hoher extrazellulärer Glutamatspiegel und damit von Neurotoxizität (Auger & Attwell, 2000). Übereinstimmend mit den bisherigen Ergebnissen konnte weiterhin *in vitro* im Mäusegehirn gezeigt werden, dass Makrophagen eine durch NMDA-Rezeptoren vermittelte Neurotoxizität einleiten, indem sie vermehrt Glutamat sezernieren (Piani et al., 1991).

Für die vorliegende Untersuchung wurde das Putamen und der Nucleus Accumbens als Studienobjekte gewählt, da sich diese Gehirnregionen als sehr anfällig bezüglich HIV-bedingter neuronaler Läsionen herausgestellt haben und auch früh von SIV-bedingten neurodegenerativen Schädigungen betroffen sind (Paul et al., 2005; Scheller et al., 2005).

In der vorliegenden Studie kam es im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen zu einer fortschreitenden Verminderung der Glutamataufnahmeprozesse. Es konnte keine Adaptation der beiden exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 zum Schutz der Neurone gegen einen erhöhten Glutamatspiegel festgestellt werden. Auch wenn die Abnahme der Proteinexpression von EAAT1 und EAAT2 nicht immer gleich stark ausgeprägt war, so zeigte sich im Putamen sowohl bei chinesischen als auch indischen Versuchstieren im Verlauf der Infektion eine deutliche Verminderung beider glutamaterger Transporter, wobei die an AIDS erkrankten Tiere stets am stärksten betroffen waren. In unserer Arbeitsgruppe wurde dieser Zusammenhang auch auf genetischer Ebene bestätigt (Meisner, 2008), so dass die Abnahme der Proteinexpression vermutlich durch transkriptionale Regulation zustande kam. Im Nucleus Accumbens konnte zwar eine verminderte Proteinexpression von EAAT1 der chinesischen SIV-infizierten Tiere festgestellt werden, die aber kein Signifikanzniveau erreichte. Bei den indischen Tieren erwies sich der Proteingehalt für beide glutamaterge Transporter als relativ konstant, was auch für den exzitatorischen Aminosäuretransporter 2 der chinesischen Tiere galt. Für den Nucleus Accumbens wurden keine Genexpressionsanalysen durchgeführt, so dass eine Beeinträchtigung auf transkriptionaler Ebene mit anschließender Adaptation auf Proteinebene nicht ausgeschlossen werden kann.

Durch die starke Verminderung der Transporterexpression im Putamen der SIV-infizierten Tiere bricht einer der wichtigsten Schutzmechanismen gegen die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität zusammen. Hierdurch ließe sich auch der von Bossuet et al. (2004) nachgewiesene Anstieg der Glutamatkonzentration im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen erklären. Die Bedeutung der glutamatergen Transporter konnte u.a. in einem Mausmodell gezeigt werden, bei dem ein Ausschalten des EAAT2 zu progressiver Neurodegeneration und Epilepsie als Folge der gestörten Glutamat-Homöostase führte (Meldrum et al., 1999). In Übereinstimmung dazu konnten auch bei einigen unserer Versuchstiere mit AIDS epileptische Anfälle beobachtet werden.

Da die glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 hauptsächlich auf Astrozyten exprimiert werden, können Astrozyten als die bedeutendsten Zellen angesehen werden, die im gesunden Gehirn vor Neurotoxizität schützen. Allerdings wurde auch über die Anwesenheit von EAAT2 in Makrophagen und Mikroglia sowie in bestimmten neuronalen Subpopulationen pathologischer Gehirne berichtet (Thai, 2002).

Vorangehende Studien haben gezeigt, dass von aktivierten Mikroglia freigesetzte Substanzen wie z.B. TNF- α , der dafür bekannt ist, die Glutamataufnahme von Astrozyten

zu verhindern, während der HIV-Infektion überproduziert werden (Wesselingh et al., 1993). TNF- α vermindert die Expression des EAAT2 über den nukleären Transkriptionsfaktor NF- κ B (Sitcheran et al., 2005). Die beobachtete Überproduktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α durch Mikroglia könnte folglich zu einer transkriptionalen Senkung der exzitatorischen Aminosäuretransporter führen. Dieser Zusammenhang wurde bereits in anderen Studien demonstriert: TNF- α verstärkte über eine Beeinträchtigung der Glutamatwiederaufnahme die Glutamat-bedingte Neurotoxizität (Zou & Crews, 2005). Übereinstimmend damit fanden Sopper et al. (1996) einen Anstieg des TNF- α -Spiegels im SIV/Rhesusaffenmodell, der mit dem Verlauf der Infektion korrelierte. Dieses Ergebnis wurde in vorliegender Arbeit bestätigt und wird weiter unten ausführlicher diskutiert. Neben der transkriptionalen Steuerung der Expression der glutamatergen Transporter über TNF- α und NF- κ B sind auch noch weitere Regulationsmechanismen bekannt. So wurde in in-vitro Experimenten deutlich, dass die Glutamataufnahme um mehr als 60% innerhalb von sechs Stunden durch die Einwirkung der Virusproteine gp120 oder Tat gesenkt wird und dass dies mit einem Abfall von EAAT2 in astroglialen Zellen während der HIV-Infektion verbunden war (Kort, 1998). Die vorliegende Studie zeigt die fortschreitende Beeinträchtigung der EAAT-Expression im Lauf der SIV-Infektion und weist eine Abnahme des Glutamatabbaus nach, die wahrscheinlich aufgrund der Aktivierung von Immunmediatoren wie TNF- α stattfindet. Folglich stellen EAATs wahrscheinlich eine bedeutende Bestimmungsgröße der Anfälligkeit gegenüber Glutamat-vermittelter Neurotoxizität im Putamen bei HIV-Demenz dar.

4.1.2 Pharmakologische Beeinflussbarkeit von EAAT1 und EAAT2

Der oben beschriebene progressive – vorwiegend im Putamen stattfindende – Zusammenbruch des glialen Transportsystems lässt an eine mögliche therapeutische Beeinflussbarkeit der beiden exzitatorischen glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 denken. Hierbei steht vor allem der exzitatorische Aminosäuretransporter 2 im Mittelpunkt, da er für über 95% der Glutamataufnahme im menschlichen Gehirn verantwortlich ist. Dennoch wurde in einer vor kurzem veröffentlichten Studie nachgewiesen, dass auch eine Störung des EAAT1 auf dopaminergen Neuronen das antioxidative Gleichgewicht stört und die Verletzlichkeit dieser Neurone steigert (Nafia et al., 2008). Da durch die Verwendung von Hirnhomogenaten in dieser Studie nicht zwischen neurona-

ler und glialer Expression der glutamatergen Transporter unterschieden werden konnte, ist die pharmakologische Beeinflussbarkeit der EAAT1-Expression ebenfalls von Interesse. Die Verbesserung der Glutamataufnahme könnte zum einen durch eine Erhöhung der katalytischen Aktivität, zum anderen durch eine verstärkte Expression der Transporter erreicht werden (Campiani et al., 2003).

Im Nucleus Accumbens konnte für EAAT1 keine signifikante Verbesserung der relativen Proteinexpression durch Selegilin, Memantin oder Selegilin zusammen mit Memantin festgestellt werden. In den behandelten Tieren lag das Expressionsniveau ungefähr auf gleicher Höhe mit dem des leicht reduzierten Niveaus der SIV-infizierten Tiere. Die mit Selegilin behandelten gesunden Kontrolltiere zeigten allerdings eine deutliche Erniedrigung ihrer Transportproteine im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen um ca. 60%.

Die Reduktion der Proteinexpression bei den mit Selegilin behandelten Kontrolltieren zeigte sich bei EAAT2 noch deutlicher: im Vergleich zu den mit Selegilin behandelten SIV-infizierten Makakken war diese signifikant vermindert. Selegilin scheint also auf gesunde Rhesusaffen einen schädigenden oder zumindest unterdrückenden Effekt auf EAAT2 auszuüben, während es bei SIV-infizierten Tieren weder eine Verbesserung noch eine Verschlechterung der EAAT2-Expression bewirkt. Auch die Behandlung mit Memantin oder der Kombination aus Memantin und Selegilin veränderte das Expressionsniveau von EAAT2 im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Tieren nicht.

Bezüglich der Behandlung mit den Antioxidantien NAC und Melatonin ließ sich nur für ihre Kombination mit Selegilin bei den SIV-infizierten Tieren eine signifikante Steigerung der EAAT1-Expression im Vergleich zu den SIV-infizierten sowie zu den SIV-infizierten und mit Selegilin behandelten Tieren nachweisen. Unter der alleinigen Behandlung mit NAC und Melatonin blieb das EAAT1-Expressionsniveau unverändert auf Höhe der SIV-infizierten Tiere. Für den glutamatergen Transporter EAAT2 änderte sich die Proteinexpression weder durch die Therapie mit den beiden Antioxidantien allein noch in Kombination mit Selegilin.

Da im Nucleus Accumbens nur für EAAT1 eine Abnahme der Proteinexpression der SIV-infizierten Makakken im Vergleich zu den Kontrolltieren und die EAAT2-Expression durch die SIV-Infektion unbeeinträchtigt blieb, erscheint eine pharmakologische Beeinflussung des EAAT2 auf den ersten Blick unnötig. Unter Umständen könnte aber eine Steigerung des EAAT2 den teilweisen Ausfall des EAAT1 ausgleichen. Eine direkte Kompensation der Einschränkung des EAAT1 ließ sich in der vorliegenden

Studie durch Behandlung mit einer Kombination von Selegilin, NAC und Melatonin erreichen.

Auch im Putamen scheint sich das Antiparkinsonmedikament Selegilin negativ auf die Proteinexpression des EAAT1 auszuwirken: alle mit diesem Medikament behandelten Tiere zeigten eine deutliche Reduktion ihrer EAAT1-Expression, die in etwa auf Höhe der SIV-infizierten Makakken lag. Das heißt, dass Selegilin auch in gesunden Tieren die Expression des EAAT1 auf das Niveau von mit SIV-infizierten Affen herunterregulierte und die Behandlung mit Selegilin gegenüber unbehandelten infizierten Tieren keinerlei Vorteile in der Proteinexpression brachte. Dagegen konnte für Memantin eine signifikante Steigerung der EAAT1-Expression im Vergleich zu SIV-infizierten Tieren ermittelt werden. Bei den Versuchstieren, denen sowohl Memantin als auch Selegilin verabreicht worden war, hebt Selegilin den positiven Effekt des Memantins auf. Wie weiterführende Analysen der Genexpression derselben Versuchstiere ergab, bewerkstelligt Memantin die Steigerung der EAAT1-Expression mittels transkriptionaler Regulation, während Selegilin die Proteinexpression des EAAT1 über einen posttranskriptionalen Effekt vermindert (Meisner, 2008).

Hinsichtlich EAAT2 waren die Ergebnisse tendentiell ähnlich, nur wesentlich geringer ausgeprägt. Die niedrigste Proteinexpression fand sich in den mit Selegilin behandelten Kontrolltieren, die höchste in den mit Memantin behandelten SIV-infizierten Tieren. Grundsätzlich erwies sich jedoch die EAAT2-Expression über alle Versuchstiergruppierungen hinweg als relativ konstant, wobei sich in den mit Selegilin behandelten SIV-infizierten Tieren eine leichte Reduktion der Proteinexpression andeutet.

Die Behandlung mit den Antioxidantien NAC und Melatonin führte im Putamen sowohl für EAAT1 als auch für EAAT2 zu einer deutlichen Steigerung der Proteinexpression im Vergleich zu den unbehandelten SIV-infizierten Tieren. Ganz anders als die negativen Auswirkungen der gleichzeitigen Gabe von Selegilin und Memantin, konnte durch die Kombination von Selegilin mit den beiden Antioxidantien eine weitere Anhebung der Expressionsrate verglichen mit der alleinigen antioxidativen Therapie erreicht werden. Für EAAT1 war die Steigerung deutlicher als für EAAT2 und für die Kombination NAC, Melatonin und Selegilin im Vergleich zu den SIV-infizierten Tieren sogar signifikant.

Insgesamt lassen die gewonnenen Ergebnisse auf einen negativen Einfluss des MAO-B-Hemmers Selegilin auf die glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 sowohl im Nucleus Accumbens als auch im Putamen schließen. Zuvor durchgeführte Studien teilen diese Beobachtung. Selegilin induziert in SIV-infizierten Rhesusaffen neuropathologische Veränderungen und verstärkt die Virusreplikation (Czub et al., 2001). Außerdem erhöht es über die verbesserte Verfügbarkeit von Dopamin die Viruslast und die mikrogliale Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α (Czub et al., 2004). Der erhöhte TNF α -Spiegel wiederum senkt auf transkriptionalem Weg die Expression des EAAT2 in Abhängigkeit vom nukleären Faktor Kappa-B (NF- κ B) (Sitcheran et al., 2005). Ein weiterer Erklärungsansatz für den schädlichen Einfluss von Selegilin auf die Expression von EAAT1 und EAAT2 könnte in der leichten Autoxidation des Dopamins und der damit verbundenen Bildung von freien Radikalen liegen (Koutsilieri, 2002a). Allerdings zeigten Miralles et al. (2001), dass oxidativer Stress die Aktivität und nicht die Expression der glutamatergen Transporter EAAT1, 2 und 3 auf Astrozyten beeinträchtigt. Demnach wären die in vorliegender Studie gemachten Beobachtungen auf andere Mechanismen zurückzuführen. Vorstellbar wären auch Effekte, die über Dopaminrezeptoren vermittelt werden. Obgleich ein Zusammenspiel zwischen EAATs und Dopaminrezeptoren bisher nicht erforscht ist, so wurde doch zumindest auf Astrozyten der Basalganglien die Expression von Dopaminrezeptoren nachgewiesen (Miyazaki et al., 2004).

Der in vorliegender Arbeit gefundene positive Effekt des NMDA-Antagonisten Memantin auf die Expression der glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 wurde bisher in der Literatur noch nie diskutiert. Immerhin ist bekannt, dass Memantin den gp120-induzierten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in Astrozyten senkt (Holden et al., 1999). Auf diese Weise könnte Memantin den vor allem in der Neurotoxizität entgleisten intrazellulären Kalziumspiegel wieder ins Gleichgewicht bringen. Memantin reguliert neben seinem NMDA-Antagonismus auch zahlreiche Gene der Ratte herauf (Marvanova et al., 2004), so dass eine transkriptionale Beeinflussung der beiden glutamatergen Transporter möglich erscheint. Des Weiteren wurde in einer vorangehenden Studie unserer Forschungsgruppe gezeigt, dass Memantin im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen die Expression des Neurotrophins BDNF steigert (Meisner, Neuen-Jacob et al., 2008). BDNF wiederum führt zu einer gesteigerten Expression des EAAT2 in Astrozyten (Rodriguez-Kern et al., 2003).

Die Beteiligung von oxidativem Stress an neurodegenerativen Prozessen im Allgemeinen und der HIV-Demenz im Speziellen ist vielfach nachgewiesen worden (z.B. Steiner et al., 2006; Reynolds et al., 2007; Mollace et al., 2001), weshalb eine Therapie mit Antioxidantien aussichtsreich erscheint. Visalli et al. (2007) konnte zeigen, dass NAC die gp120-vermittelte Schädigung von Astrozyten, auf denen EAAT1 und EAAT2 vorwiegend exprimiert werden, verhindert. Zudem wirkt Gluthation, dessen Synthese durch NAC erhöht wird (Dringen & Hamprecht, 1999) antioxidativ in Astrozyten (Muyderman et al., 2007). NAC wirkt nicht nur antioxidativ, sondern hemmt auch die Dopaminvermittelte Aktivierung des Virus in T-Lymphozyten (Scheller et al., 2000).

Melatonin besitzt immunmodulatorische Eigenschaften (Maestroni et al., 1999) und reguliert das Neurotrophin GDNF in dopaminergen Neuronen transkriptional herauf (Tang et al., 1998). Diese Regulation hat einen stabilisierenden Einfluss auf dopaminerge Neurone (Chao & Lee, 1999) und wirkt damit einer Schädigung durch dopaminerge Dysbalance entgegen (Koutsilieri et al., 2002a). Weiterhin konnte in einer anderen Studie nachgewiesen werden, dass Melatonin in der Hypophyse von Schafen die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB verhindert (McNulty et al., 1994). CREB verursacht dopaminerge Defizite in SIV-infizierten Rhesusaffen (Jenuwein et al., 2004).

4.2 TNF- α

4.2.1 TNF- α im Verlauf der SIV-Infektion

Das Zytokin TNF- α übernimmt im Körper vielfältige Aufgaben, darunter u.a. Beteiligung an systemischen Entzündungsreaktionen, Apoptose, Tumorgenese und virale Replikation. Es wird im Rahmen der HIV- bzw. SIV-Infektion hauptsächlich durch aktivierte Mikroglia erzeugt. Auch an der Entstehung der HIV-Demenz scheint dieses Zytokin in vielerlei Hinsicht beteiligt: beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass der Spiegel an TNF- α im Gehirn HIV-infizierter Patienten erhöht war (Sippy et al., 1995), was durch das SIV/Rhesusaffenmodell bestätigt werden konnte (Sopper et al., 1996). Außerdem scheint eine Überproduktion von Zytokinen mit der SIV-Enzephalitis in Verbindung zu stehen (Orandle et al., 2002).

Die vorliegende Studie bestätigt die bisherigen Ergebnisse: im Nucleus Accumbens wurde ebenfalls ein Anstieg der Proteinexpression des TNF- α in indischen SIV-infi-

zierten Tieren und an AIDS erkrankten hauptsächlich indischen Tieren im Vergleich zu indischen Kontrolltieren gefunden. Dieser Zusammenhang galt allerdings nicht für die chinesischen Tiere, deren SIV-infizierte Tiere sich nicht von den Kontrollen unterschieden, dafür aber signifikant unter dem Wert der Proteinexpression der SIV-infizierten indischen Rhesusaffen lagen.

Doch nicht nur eine gesteigerte Konzentration des TNF- α , sondern auch die gesteigerte transkriptionale Regulierung dieses Zytokins scheint für den Verlauf der HIV-Infektion typisch zu sein (Nuovo et al., 1994). Über eine Familie an Transkriptionsfaktoren, die unter der Bezeichnung NF- κ B zusammengefasst werden und auch an der Regulation der EAAT2-Expression beteiligt sind, greift TNF- α in die Transkription im ZNS ein (Silverman & Maniatis, 2001; O'Neill & Kaltschmidt, 1997).

In vorliegender Arbeit wurde im Putamen ebenfalls eine signifikant gesteigerte Genexpression des TNF- α der SIV-infizierten chinesischen Tiere im Vergleich zu den chinesischen Kontrollen gefunden. Dasselbe – wenn auch nicht signifikante – Verhältnis konnte bei der Expression der indischen mRNA ermittelt werden, wobei die Gruppe der an AIDS erkrankten Tiere wiederum eine signifikant höhere mRNA-Expression des TNF- α im Vergleich zu den indischen Kontrollen aufwies.

Zusammenfassend ließ sich also die in der Literatur diskutierte Steigerung des TNF- α im Verlauf der SIV-Infektion sowohl auf genetischer, als auch auf der Proteinebene bestätigen. TNF- α scheint die HIV-Demenz auf viele unterschiedliche Wege negativ zu beeinflussen. So leitet dieses Zytokin beispielsweise die Proliferation von Astrozyten und die damit verbundene Astroglieose samt kognitiver Beeinträchtigungen ein (Seilhean et al., 1997). Wilt et al. (1995) konnten darüber hinaus demonstrieren, dass TNF- α durch aktivierte Immunzellen die Virusreplikation verstärkt und Apoptose in Oligodendrozyten auslöst. Besonders interessant für die vorliegende Arbeit ist jedoch der Zusammenhang des TNF- α mit dem glutamatergen System bzw. der Regulation der glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2. Die Ergebnisse einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass die transkriptionale Herunterregulierung der glutamatergen Transporter durch TNF- α der Mikroglia induziert werden könnte (Meisner, Neuen-Jacob et al., 2008). TNF- α hemmt außerdem die Expression glialer glutamaterger Transporter, steigert die Expression von AMPA-Rezeptoren und inhibiert die Langzeitpotenzierung (Pickering et al., 2005). Einige Autoren kamen zu dem Schluss, dass TNF- α die Glutamat-vermittelte Neurotoxizität fördert (Bernardino et al., 2005; Zou & Crews, 2005; Takeuchi, 2006).

4.2.2 Pharmakologische Beeinflussbarkeit des TNF- α

Meisner (2008) fand ebenfalls in einer Untersuchung an Hirnhomogenaten im Verlauf der SIV-Infektion eine progressive Erhöhung der zum humanen Leukozytenantigen-systems gehörenden Loki HLA-DR bzw. MHC-II, die als Marker für Immunstimulierung gelten. Zusammen mit dem ansteigenden Immunmodulator TNF- α spricht dies für eine zunehmende Immunaktivierung im Verlauf der SIV-Infektion. Mononukleäre Phagozyten (Mikroglia/Makrophagen) gelten als die Hauptquelle des TNF- α im Gehirn (Wesselingh et al., 1997). Mikroglia werden vermutlich durch virale Proteine aktiviert (D'Aversa et al., 2004) und die Anzahl zirkulierender aktivierter Monozyten korreliert mit der HIV-Demenz (Pulliam et al., 1997). Dies legt den Schluss nahe, dass die mikrogliale Aktivierung durch infiltrierende Monozyten aus dem Blut zustande kommt. Wie diese Immunaktivierung aufrechterhalten wird, kann aus den vorliegenden Daten nicht abschließend beurteilt werden. Man muss jedoch annehmen, dass sie multifaktoriell bedingt ist und auch die in ihrem Verlauf produzierten Effektormoleküle wie TNF- α dabei einen wichtigen Stellenwert einnehmen.

Pharmakologische Therapieansätze zur antiinflammatorischen Beeinflussung der Immunaktivierung, deren Prinzip auf einer Hemmung von TNF- α beruht, wurden bisher für die Parkinson-Erkrankung (Qian et al., 2007), die Alzheimer-Erkrankung (Ryu & McLarnon, 2008) und auch für die HIV-Demenz (Okamoto et al., 2001; Hwang et al., 2008) ins Auge gefasst.

Die Selegilinbehandlung im Putamen in vorliegender Arbeit hatte – sowohl als alleiniger Wirkstoff als auch in Kombination mit Memantin bzw. den Antioxidantien NAC und Melatonin – keinen Einfluss auf die Genexpression des TNF- α . Auch die alleinige Gabe von Memantin oder von NAC und Melatonin veränderte auf transkriptionaler Ebene den Immunstatus der SIV-infizierten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Affen nicht. Die einzige Auffälligkeit bestand in der signifikanten Herunterregulierung der TNF- α -Expression der gesunden mit Selegilin behandelten Tiere im Vergleich zu den SIV-infizierten und mit Selegilin behandelten Rhesusaffen. Derselbe Zusammenhang wurde in dieser Arbeit auch schon bei der Proteinexpression von EAAT2 im Nucleus Accumbens festgestellt.

Bezüglich der Proteinexpression des TNF- α konnte im Nucleus Accumbens keine Änderung durch die Therapie mit Selegilin nachgewiesen werden. In Kombination mit Memantin jedoch ergab sich eine nicht signifikante Steigerung der TNF- α -Expression um ca. ein Drittel im Vergleich zu den SIV-infizierten unbehandelten Tieren. Dies ent-

sprach auch dem Wert mit alleiniger Memantinbehandlung. Die Gabe der Antioxidantien NAC und Melatonin induzierte im Nucleus Accumbens eine Erhöhung der Proteinexpression von TNF- α um knapp 40%. Zusammen mit Selegilin bewirkten die beiden Antioxidantien sogar eine Steigerung der TNF- α -Expression um den Faktor 2,5.

Der fehlende Effekt des Selegilins sowohl auf die Genexpression des TNF- α im Putamen als auch auf die Proteinexpression im Nucleus Accumbens widerspricht dem Großteil der bisher durchgeführten Studien, die Selegilin meist negative Auswirkungen auf den Infektionsverlauf attestierten. So führte Selegilin im Rattenmodell zu einer Aktivierung der Mikroglia in infizierten Tieren (Czub et al., 1999). Zudem verschlechterte sich die Neuropathologie der Versuchstiere im SIV/Rhesusaffenmodell durch Selegilin (Czub et al., 2001) und es konnte ein erhöhter TNF- α -Spiegel nachgewiesen werden (Czub et al., 2004). Zumindest in Kombination mit den beiden Antioxidantien NAC und Melatonin wirkte Selegilin in vorliegender Studie auf gleiche Weise. Andere Arbeiten mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes deuten in die entgegengesetzte Richtung: zwar hatte dort Selegilin auch eine immunstimulierende Wirkung, die sich aber nur auf die Heraufregulierung der Zytokine Interleukin-1 β und Interleukin-6 erstreckte, während TNF- α sank (Wilfried et al., 1996). Die Erkenntnisse der verfügbaren Literatur sind also nicht ganz eindeutig, wenn auch die Mehrzahl der Autoren einen deutlich schädigenderen Einfluss von Selegilin in Form einer Heraufregulierung bzw. Erhöhung des TNF- α erwartet hätte, als er in der vorliegenden Studie zum Tragen kommt. Da bezüglich der beiden glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 in vorliegender Arbeit ein negativer Effekt des Selegilins in Form einer Verminderung ihrer Proteinexpression festgestellt werden konnte, soll nicht unerwähnt bleiben, dass TNF- α zum Teil auch neuroprotektive Wirkung entfalten kann (Saha & Pahan, 2003; Li et al., 2007). Dies gilt auch für aktivierte Immunzellen, was vor allem in der Frühphase der Infektion von Bedeutung ist (Gras et al., 2003). So könnte man sich unter Umständen den unerwarteten signifikanten Anstieg von TNF- α unter der Behandlung der beiden neuroprotektiven Antioxidantien NAC und Melatonin erklären. Zweifellos muss aber konstatiert werden, dass die in vorliegender Studie gemachten Beobachtungen in bisher keiner anderen Arbeit erwähnt wurden. Da TNF- α im Verlauf der HIV- bzw. SIV-Infektion zunimmt und auch in der Neurotoxizität eine große Rolle spielt, sollte es durch Antioxidantien herunter reguliert bzw. vermindert werden. So konnten beispielsweise Oka et al. (2000) zeigen, dass NAC die TNF- α -vermittelte Ak-

tivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B inhibiert. Melatonin schwächte in muriner Zellkultur die Apoptose ab und inhibierte ebenfalls die NF- κ B-Aktivierung (Jang et al., 2005). Dagegen haben die Antioxidantien NAC und Melatonin in vorliegender Studie keinen Effekt auf die Transkription von TNF- α , auf Proteinebene bewirken sie eine starke Erhöhung der TNF- α -Expression und wirken damit deutlich immunstimulierend. Zur endgültigen Klärung der Wirkweise von Antioxidantien auf TNF- α sind wohl noch weitere Analysen nötig. Antioxidantien können zum einen direkt einen schützenden Effekt über das Abfangen freier Radikale ausüben, zum anderen indirekt Glia-vermittelte entzündliche Prozesse hemmen (Wang et al., 2006), so dass die Zusammenhänge möglicherweise noch komplexer sind als bisher angenommen.

Memantin hatte in vorliegender Studie im Putamen auf transkriptionaler Ebene keine Veränderung der TNF- α -Expression bewirkt, auf Proteinebene dagegen fand eine deutliche Erhöhung der Expression des TNF- α statt. Dies legt den Schluss nahe, dass Memantin auf einer posttranskriptionalen Ebene immunstimulierend wirkt, wenn auch einschränkend gesagt werden muss, dass die Analyse der Genexpression und der Proteinexpression in zwei jeweils unterschiedlichen Hirnregionen stattfand und sich somit eine direkte Schlussfolgerung verbietet. Bereits oben wurde dargestellt, dass die weit über einen bloßen NMDA-Antagonismus hinausgehenden Wirkungen von Memantin noch nicht ausreichend erforscht sind. EAAT1 schien Memantin in vorliegender Studie auf transkriptionalem Wege zu erhöhen. In unserer Arbeitsgemeinschaft wurde eine durch Memantin bewirkte Heraufregulierung des Neurotrophins BDNF nachgewiesen (Meisner, Scheller et al., 2008). An einem Rattenmodell der Alzheimer-Erkrankung konnte hingegen keine vermehrte Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten beobachtet werden (Ahmed et al., 2004). In einem weiteren Rattenmodell einer autoimmunen Enzephalitis wurde ebenfalls kein Einfluss von TNF- α auf die Entzündung im Gehirn gefunden (Wallstrom et al., 1996). Im SIV/Rhesusaffenmodell konnte auch keine immunologische Beeinflussbarkeit der Infektion durch Memantin festgestellt werden (Meisner, Scheller et al., 2008). Der immunstimulierende Effekt von Memantin im Rahmen der SIV-Enzephalitis wurde also erstmals in der vorliegenden Studie beschrieben und sollte deshalb durch weitere Arbeiten verifiziert werden.

4.3 Unterschiede zwischen Putamen und Nucleus Accumbens hinsichtlich der Expression von EAAT1, EAAT2 und TNF- α sowie ihrer pharmakologischen Beeinflussbarkeit

Schädigungen des Putamens äußern sich in Parkinson-ähnlichen motorischen Defiziten (Berger & Arendt, 2000) während Störungen des Nucleus Accumbens eher neuropsychiatrische Komplikationen nach sich ziehen (Koutsilieri, 2002b). Leider haben Regionen der Basalganglien, die eher für Affekte zuständig sind, in der Forschung bisher weniger Beachtung gefunden als Regionen, welche motorische Abläufe regulieren. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass motorische Störungen wesentlich einfacher zu diagnostizieren sind und affektive Beeinträchtigungen oft schwer von reaktiven psychologischen Veränderungen abgrenzbar sind.

Dass der Nucleus Accumbens jedoch deutlich durch die HIV-Infektion beeinträchtigt wird, stellten unter anderem Paul et al. (2005) in einer klinischen Studie fest: Patienten mit verringerten Volumina des Nucleus Accumbens zeigten verstärkt Zeichen von Apathie. Eine frühere Studie unserer Forschungsgruppe konnte dopaminerge Defizite im Nucleus Accumbens mit Hilfe des SIV/Rhesusaffen-Modells nachweisen (Jenuwein et al., 2004).

In vorliegender Arbeit zeigte sich im Nucleus Accumbens lediglich für die Proteinexpression des EAAT1 eine leichte Abnahme, während es im Putamen sowohl für EAAT1 als auch für EAAT2 im Verlauf der Infektion zu einer jeweils signifikanten Verminderung der Proteinexpression kam. Dies lässt vermuten, dass die SIV-Infektion im Nucleus Accumbens nur eine leichte Beeinträchtigung des glutamatergen Transportes bewirkte. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Expression und Aktivität der Transporter auf verschiedene Weise reguliert werden kann (Gegelashvili & Schousboe, 1997). Weitere Untersuchungen sind unverzichtbar, um beispielsweise Anpassungen durch Phosphorylierung (Conradt & Stoffel, 1997) oder Translokation (Duan et al., 1999) zu erfassen. Aus Analysen zur Amyotrophen Lateralsklerose und der Alzheimer Demenz sind auch posttranslationale Anpassungen der EAAT2-Expression beschrieben worden (Tian et al., 2007).

Ein anderer sehr plausibler Erklärungsansatz für die unterschiedliche Beeinträchtigung des glutamatergen Transportsystems des Nucleus Accumbens und des Putamen könnte in einem unterschiedlichen synaptischen Aufbau des glutamatergen Systems in bei-

den Gehirnregionen begründet liegen. So könnte die SIV-Infektion im Nucleus Accumbens beispielsweise eher zu einer veränderten Regulation der NMDA-Rezeptoren führen als dass sie sich in einer Beeinträchtigung des glutamatergen Transportsystems durch EAAT1 und EAAT2 niederschlägt. Denkbar ist auch, dass sich im Nucleus Accumbens die NMDAR-Rezeptoren aus anderen Untereinheiten zusammensetzen als im Putamen und somit auch ihre Regulation anderen Mechanismen unterworfen ist. Interessante Hinweise zur Unterlegung dieser Überlegung finden sich in einer weiterführenden Untersuchung unserer Arbeitsgruppe: Meisner (2008) konnte für das Putamen einen fortschreitenden Verlust der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoruntereinheiten (NR) NR2A und NR2B mit Progression des Krankheitsverlaufs im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen nachweisen. Diese Abnahme zeigte sich sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene, was auf eine transkriptionale Regulation schließen lässt. Im Nucleus Accumbens dagegen konnte eine Abnahme der NR1-Expression durch die SIV-Infektion ermittelt werden. Die Untereinheit NR2A wurde im Nucleus Accumbens von SIV-infizierten Tieren in der asymptomatischen Phase zunächst herunter reguliert, um dann bei Ausbruch von AIDS herauf reguliert zu werden. Die Expression der Untereinheit NR2B war bei chinesischen Tieren signifikant gesteigert, während sich bei indischen Makakken eine Abnahme fand. Die Regulation der NMDA-Rezeptoren im Nucleus Accumbens weicht insgesamt also deutlich von der im Putamen ab und spricht damit für eine je nach Hirnregion spezifische Expression der NMDAR-Untereinheiten. Es wäre durchaus vorstellbar, dass dadurch auch Unterschiede in der Regulation des glutamatergen Transports mittels EAAT1 und EAAT2 hervorgerufen werden könnten.

Die Behandlung mit Selegilin induzierte im Nucleus Accumbens eine deutliche Reduktion der EAAT1-Expression in gesunden Tieren, für EAAT2 war die Abnahme der Proteinexpression im Vergleich zu SIV-infizierten mit Selegilin behandelten Versuchstieren sogar signifikant. Im Putamen führte Selegilin weder bei EAAT1 noch bei EAAT2 zu einer größeren Veränderung.

Dagegen zeigten sich für die Behandlung mit Memantin im Putamen wesentlich stärkere Auswirkungen als im Nucleus Accumbens: vor allem für EAAT1 ergab sich eine signifikant höhere Proteinexpression unter der Behandlung mit Memantin im Vergleich zu den unbehandelten SIV-infizierten Affen. Für EAAT2 war diese Erhöhung zwar wesentlich geringer ausgeprägt, aber doch deutlicher vorhanden als im Nucleus Accumbens, bei dem nicht die kleinste Verbesserung der Proteinexpression durch die Therapie

mit Memantin festzustellen war. Da Memantin u.a. über seinen NMDAR-Antagonismus wirkt und die Beeinträchtigung der EAATs und damit auch die Dysbalance der Glutathomöostase vor allem im Putamen statt fand, erscheint dieser Unterschied zwischen den beiden Hirnregionen folgerichtig.

Die beschriebenen Unterschiede hinsichtlich der pharmakologischen Beeinflussbarkeit zwischen Putamen und Nucleus Accumbens könnten auch durch für die jeweilige Hirnregion spezifische Differenzen in der Transporterregulation entstanden sein (Lehre et al., 1995; Schluter et al., 2002).

Was die Behandlung mit den Antioxidantien NAC und Melatonin anbelangt, so fanden sich kaum Unterschiede in ihrer Wirkweise auf die beiden Hirnregionen des Putamen und Nucleus Accumbens. In beiden Hirnstrukturen erhöhten NAC und Melatonin die Proteinexpression von EAAT1 deutlich, in Kombination mit Selegilin sogar signifikant im Vergleich zu SIV-infizierten Versuchstieren. Für EAAT2 war im Putamen die Erhöhung der Proteinexpression noch nachweisbar, wenn sie auch nicht mehr Signifikanzniveau erreichte, während sich die Proteinexpression des EAAT2 im Nucleus Accumbens auf gleichem Niveau wie das der unbehandelten Tiere befand.

Die relativ gleichartige Wirkung auf Putamen und Nucleus Accumbens lässt sich vermutlich auf den relativ unspezifischen Wirkmechanismus der Antioxidantien, der im Abfangen freier Radikale besteht und wohl in jeder Hirnregion auf gleiche Weise funktionieren müsste, erklären.

4.4 Unterschiede in der Expression von EAAT1, EAAT2 und TNF- α sowie im Krankheitsverlauf chinesischer und indischer Rhesusaffen

Weder im Putamen noch im Nucleus Accumbens finden sich signifikante Unterschiede bezüglich der Expression des EAAT1 und EAAT2 zwischen den uninfizierten Kontrollen bzw. den SIV-infizierten Rhesusaffen chinesischer und indischer Herkunft. Da die Gruppe der an AIDS erkrankten Tiere nur ein chinesisches Tier mit einschließt, ist ein Vergleich zwischen chinesischen und indischen an AIDS erkrankten Makakken aus statistischen Gründen nicht möglich.

Hinsichtlich der Proteinexpression des TNF- α konnte im Nucleus Accumbens kein Unterschied zwischen chinesischen und indischen Kontrolltieren festgestellt werden. Al-

lerdings übersteigt die Proteinexpression des TNF- α der indischen SIV-infizierten Tiere die der chinesischen SIV-infizierten Versuchstiere signifikant um das Doppelte.

Im Putamen fand sich sowohl für die Kontrolltiere als auch für die SIV-infizierten Rhesusaffen eine deutlich höhere Genexpression des TNF- α der indischen im Vergleich zu den chinesischen Tieren.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das Immunsystem indischer Tiere nicht in der Lage ist, die SIV-Infektion ebenso effektiv zu bekämpfen wie das Immunsystem chinesischer Makakken. Eine Erhöhung des TNF- α geht zudem meist mit einem schnelleren Krankheitsverlauf einher und kann auch in Zusammenhang mit dem häufigeren Tod indischer SIV-infizierter Tiere gesehen werden. Da chinesische Rhesusaffen äußerst selten AIDS entwickeln und meist auch nicht frühzeitig an ihrer SIV-Infektion versterben wie indische Affen, findet sich in unserer AIDS-Gruppierung auch nur ein chinesisches Tier.

Penedo (2005) zeigte in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gefundenen Unterschieden, dass chinesische und indische Rhesusaffen anhand genetischer Marker in zwei Subspezies geteilt werden können. In weiteren Untersuchungen konnten Unterschiede in der Viruslast und im Krankheitsverlauf der SIV-Infektion bei Makakken unterschiedlicher geographischer Herkunft beobachtet werden (Trichel, 2002). Die von Kneitz et al. (2007) durchgeführte Microarray-Analyse ergab, dass Versuchstiere indischer Herkunft und AIDS-Tiere von den chinesischen Tieren separat gruppiert wurden (Kneitz et al., 2007). Darüber hinaus konnte in der eben erwähnten Studie auch keine Übereinstimmung der im Verlauf einer SIV-Infektion regulierten Gene zwischen chinesischen und indischen Rhesusaffen festgestellt werden. Dies verdeutlicht, dass bei Untersuchungen mit dem SIV/Rhesusaffenmodell stets die Herkunft der Tiere berücksichtigt werden muss, da deren unterschiedliche Genexpression die Auslegung von Ergebnissen beeinflusst.

Die größere Nähe der indischen Versuchstiere zu den an AIDS erkrankten Tieren in der Microarray-Analyse spiegelt sich klinisch u.a. auch in der Tatsache wider, dass es unter indischen Tieren zu einem deutlich höheren Anteil an „rapid progressors“ - d.h. Tieren mit schnellerem Krankheitsverlauf - kommt als unter chinesischen Affen. Obwohl sich prinzipiell sowohl bei chinesischen als auch bei indischen Versuchstieren ein sog. rapider progressiver Infektionsverlauf entwickeln kann (Marthas et al., 2001), so ist der An-

teil an „rapid progressors“ bei den chinesischen Rhesusaffen mit 2% im Vergleich zu 25% bei indischen Rhesusaffen doch ungleich niedriger (Sauer mann et al., 2000).

Die schlechtere gesundheitliche Verfassung der indischen im Vergleich zu den chinesischen Rhesusaffen konnte in vorliegender Arbeit für die TNF- α -Expression bestätigt werden. Sowohl im Putamen wie auch im Nucleus Accumbens exprimierten die indischen Tiere - wie oben bereits ausführlicher geschildert - mehr TNF- α , der zu den prognostisch ungünstigen Markern für den Verlauf der SIV-Infektion zählt, als die chinesischen Versuchstiere. Was die EAAT-Expression anbelangt, wichen die Ergebnisse dieser Studie von der Erwartung ab: lediglich die EAAT1-Expression der SIV-infizierten chinesischen Tiere zeigte eine Erniedrigung, was für einen schnelleren Verlauf der SIV-Infektion bei den chinesischen Tieren spräche. Ansonsten waren hinsichtlich der Expression des EAAT1 und EAAT2 keine Unterschiede zwischen den Subspezies nachweisbar. Ling et al. (2002) kommen zu dem Schluss, dass chinesische Makakken aufgrund ihres weniger pathogenen Krankheitsverlaufs ein besseres Modell für die HIV-Infektion darstellen als indische Rhesusaffen. Denn auch beim Menschen kommt es wie bei den Tieren aus China nach der Infektion zunächst zu einer langen Plateauphase, in welcher das Immunsystem die Vermehrung des Virus soweit kontrollieren kann, dass keine schweren klinischen Krankheitssymptome entwickelt werden.

Die Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussbarkeit des EAAT1 und EAAT2 sowie des TNF- α wurden ausschließlich an chinesischen Rhesusaffen durchgeführt. So stellt die mögliche unterschiedliche Immunreaktion der beiden Subspezies keine Störvariable bei der Interpretation der Ergebnisse dar.

5. Zusammenfassung

Obwohl die Symptomatik der HIV-Demenz schon seit dem Beginn der AIDS-Pandemie bekannt ist, sind die genauen Mechanismen ihrer Neuropathologie immer noch ungeklärt. Trotz Einführung der HAART mit der damit verbundenen Abnahme der Inzidenz der HIV-Demenz sind die Behandlungsergebnisse bislang nicht zufrieden stellend: eine spezifische Therapie fehlt und die Prävalenz der HIV-Demenz nimmt aufgrund gesteigerter Lebenserwartung der behandelten Patienten stetig zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen des SIV/Rhesusaffenmodells eine neurodegenerative Erkrankung induziert, welche aktuell die HIV-Demenz beim Menschen am zuverlässigsten abbildet. Der Prozess der Exzitotoxizität gilt als einer der wichtigsten Faktoren der neuronalen Schädigung im Rahmen der HIV-Demenz. Deshalb wurde in vorliegender Arbeit die Proteinexpression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2, deren Hauptaufgabe in der Verhinderung zu hoher Glutamatspiegel durch Glutamatabtransport aus dem synaptischen Spalt besteht, im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen untersucht. In der komplexen Entstehung der Neurodegeneration durch SIV spielen auch aktivierte Monozyten und Mikroglia eine große Rolle. Sie sezernieren u.a. TNF- α , der als potentiell Neurotoxin ebenfalls zur Entwicklung der SIV-Enzephalitis beizutragen scheint. Sowohl Protein- als auch Genexpression des TNF- α wurde in vorliegender Arbeit analysiert. Als anatomische Grundlage der vorliegenden Untersuchung wurden das Putamen und der Nucleus Accumbens ausgewählt, da beide Strukturen sich als besonders anfällig für neuronale Schäden im Rahmen der HIV-Demenz erwiesen hatten. Das Putamen ist als Teil der Basalganglien in erster Linie für die extrapyramidale Steuerung der Motorik zuständig. Der Nucleus Accumbens integriert affektives und motivationales Verhalten in die Bewegungsabläufe und lässt sich sowohl den Basalganglien als auch dem mesolimbischen dopaminergen Belohnungssystem zuordnen.

Mit dem Ziel einer möglichen pharmakologischen Behandlung der HIV-Demenz wurde der MAO-B-Hemmer Selegilin, der NMDAR-Antagonist Memantin sowie die beiden Antioxidantien NAC und Melatonin an SIV-infizierten Rhesusaffen getestet.

Die Proteinexpression der glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 der SIV-infizierten Rhesusaffen zeigte sich im Putamen als signifikant vermindert im Vergleich

zu den uninfizierten Kontrolltieren. Der größte Einbruch konnte aber bei den an AIDS erkrankten Tieren festgestellt werden: sowohl im Vergleich zu den gesunden Kontrollen als auch im Vergleich zu den SIV-infizierten Affen war eine signifikante Senkung der EAAT1- und EAAT2-Expression offensichtlich. Im Nucleus Accumbens fand sich eine relativ konstante Expression des EAAT1 und EAAT2.

Die Proteinexpression des TNF- α im Nucleus Accumbens stieg bei indischen SIV-infizierten Tieren und an AIDS erkrankten Tieren im Vergleich zu indischen Kontrolltieren. Die Genexpression des TNF- α der indischen Tiere erhöhte sich im Putamen ebenfalls im Verlauf der Infektion, wobei es bei den AIDS-Tieren sogar zu einer im Vergleich zu den indischen Kontrollen signifikanten Erhöhung kam. Auch bei den SIV-infizierten chinesischen Tieren konnte im Putamen eine signifikant gesteigerte Genexpression des TNF- α im Vergleich zu den chinesischen Kontrollen gefunden werden, während die chinesischen Tiere im Nucleus Accumbens keine Änderung ihrer Proteinexpression zeigten.

Im Nucleus Accumbens konnte weder für EAAT1 noch für EAAT2 eine signifikante Verbesserung der relativen Proteinexpression durch Selegilin, Memantin oder einer Kombination beider Präparate im Vergleich zu den unbehandelten SIV-infizierten Tieren festgestellt werden. Bezüglich der Behandlung mit den Antioxidantien NAC und Melatonin ließ sich nur für ihre Kombination mit Selegilin eine signifikante Steigerung der EAAT1-Expression im Vergleich zu den SIV-infizierten Tieren nachweisen. Für den glutamatergen Transporter EAAT2 änderte sich die Proteinexpression weder durch die Therapie mit den beiden Antioxidantien allein noch in Kombination mit Selegilin.

Auch im Putamen zeigten alle mit Selegilin behandelten Tiere eine Proteinexpression des EAAT1, die in etwa auf Höhe der unbehandelten SIV-infizierten Makakken lag. Dagegen konnte für Memantin eine signifikante Steigerung der EAAT1-Expression im Vergleich zu SIV-infizierten Tieren ermittelt werden. Bei den Versuchstieren, denen sowohl Memantin als auch Selegilin verabreicht worden war, hebt Selegilin den positiven Effekt des Memantins auf. Hinsichtlich EAAT2 waren die Ergebnisse im Putamen tendenziell ähnlich, nur wesentlich geringer ausgeprägt. Die Behandlung mit den Antioxidantien NAC und Melatonin führte im Putamen sowohl für EAAT1 als auch für EAAT2 zu einer deutlichen Steigerung der Proteinexpression im Vergleich zu den unbehandelten SIV-infizierten Tieren. Durch die Kombination von Selegilin mit den beiden Antioxidantien konnte eine weitere Anhebung der Expressionsrate erreicht werden.

Für EAAT1 war die Steigerung deutlicher als für EAAT2 und für die Kombination NAC, Melatonin und Selegilin im Vergleich zu den SIV-infizierten Tieren sogar signifikant.

Die Selegilinbehandlung im Putamen in vorliegender Arbeit hatte keinen Einfluss auf die Genexpression des TNF- α . Auch die Gabe von Memantin oder von NAC und Melatonin veränderte auf transkriptionaler Ebene den Immunstatus der SIV-infizierten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Affen nicht.

Bezüglich der Proteinexpression des TNF- α konnte im Nucleus Accumbens keine Änderung durch die Therapie mit Selegilin nachgewiesen werden. Die Gabe der Antioxidantien NAC und Melatonin induzierte jedoch im Nucleus Accumbens eine Erhöhung der Proteinexpression von TNF- α . Zusammen mit Selegilin bewirkten die beiden Antioxidantien eine signifikante Steigerung der TNF- α -Expression.

Der in anderen Studien beobachtete ungünstigere Krankheitsverlauf bei indischen Rhesusaffen konnte im Sinne einer höheren TNF- α -Expression im Nucleus Accumbens und Putamen auch in dieser Arbeit gefunden werden, die Expression des EAAT1 und EAAT2 war jedoch bei beiden Subspezies weitgehend gleich ausgeprägt.

Es gelang in vorliegender Arbeit erstmals, den dramatischen Verlust der glutamatergen Transporter EAAT1 und EAAT2 im Verlauf der SIV-Infektion nachzuweisen. Hiervon war hauptsächlich das Putamen und weniger der Nucleus Accumbens betroffen. Ein Anstieg des Zytokins TNF- α fand sich mit fortschreitender Infektionsdauer in beiden Hirnregionen. Die fehlende Eignung von Selegilin als neuroprotektive Substanz im Rahmen der SIV-Enzephalitis konnte repliziert werden. Memantin und die beiden Antioxidantien NAC und Melatonin hingegen verbessern in weiten Teilen die Expression der exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1 und EAAT2 und wirken immunstimulierend, was sie zu interessanten Kandidaten einer möglichen neuroprotektiven Medikation macht.

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht (in Meisner, Neuen-Jacob et al., 2008).

6. Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. (2007). *Cellular and molecular immunology* (6th ed.). Philadelphia, USA: Saunders/Elsevier.
- Ahmed, M.M., Hoshino, H., Chikuma, T., Yamada, M. & Kato, T. (2004). Effect of memantine on the levels of glial cells, neuropeptides, and peptide-degrading enzymes in rat brain regions of ibotenic acid-treated alzheimer's disease model. *Neuroscience*, **126**, 639-649.
- Albright, A.V., Soldan, S.S. & Gonzalez-Scarano, F. (2003). Pathogenesis of human immunodeficiency virus-induced neurological disease. *J. Neurovirol.* **9**, 222-227.
- Amara, S.G. & Fontana, A.C. (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* **41**, 313-318.
- Andoh, T., Chock, P.B., Murphy, D.L. & Chiueh, C.C. (2005). Role of the redox protein thioredoxin in cytoprotective mechanism evoked by (-)-deprenyl. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1408-1414.
- Anderson, E., Zink, W., Xiong, H. & Gendelman, H.E. (2002). HIV-1-associated dementia: a metabolic encephalopathy perpetrated by virus-infected and immune-competent mononuclear phagocytes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **31** (2), 43-54.
- Arendt, G., Maecker, H.P., Purrmann, J. & Homber, V. (1994). Control of posture in patients with neurologically asymptomatic HIV infection and patients with beginning HIV-1-related encephalopathy. *Arch. Neurol.* **51** (12), 1232-1235.
- Attwell, D. (1994). Neurobiology-glia and neurons in dialogue. *Nature* **369**, 707-708.
- Auger, C. & Attwell, D. (2000). Fast removal of synaptic glutamate by postsynaptic transporters. *Neuron* **28**, 547-558.
- Bacellar, H., Munoz, A., Miller, E.N., Cohen, B.A., Besley, D., Selnes, O.A., Becker, J.T. & McArthur, J.C. (1994). Temporal trends in the incidence of HIV-1-related neurologic diseases: Multicenter AIDS cohort study, 1985-1992. *Neurology* **44** (10), 1892-1900.
- Banati, R.B., Gehrman, J., Schubert, P. & Kreutzberg, G.W. (1993). Cytotoxicity of microglia. *Glia* **7**, 111-118.
- Banks, W.A., Freed, E.O., Wolf, K.M., Robinson, S.M., Franko, M. & Kumar, V.B. (2001). Transport of human immunodeficiency virus type 1 pseudoviruses across the blood-brain barrier: role of envelope proteins and adsorptive endocytosis. *J. Virol.* **75**, 4681-4691.
- Beal, M.F. (1998). Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann. Neurol.* **44**, 110-114.

- Bender MedSystems (2008). Monkey TNF- α ELISA, BMS644/3. *Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of monkey TNF- α . Product information and manual.* Wien: Bender MedSystems GmbH.
- Benveniste, E.N. (1997). Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J. Mol. Med.* **75**, 165-173.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2007). *Biochemie* (6.Aufl.). München: Spektrum Akademischer Verlag.
- Berger, J.R. & Arendt, G. (2000). HIV dementia: the role of the basal ganglia and dopaminergic systems. *J. Psychopharmacol.* **14**, 214-221.
- Bernardino, L., Xapelli, S., Silva, A.P., Jakobsen, B., Poulsen, F.R., Oliveira, C.R., Vezzani, A., Malva, J.O. & Zimmer, J. (2005). Modulator effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J. Neurosci.* **25**, 6734-6744.
- BioRad (2007). *Quick Start Bradford Protein Assay. Instruction Manual.* München: BioRad Laboratories GmbH.
- Block, M.L. & Hong, J.S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol.* **76**, 77-98.
- Bloom, F.E. & Rausch, D.M. (1997). HIV in the brain: pathology and neurobehavioral consequences. *J. Neurovirol.* **3**, 102-109.
- Bobardt, M.D., Salmon, P., Wang, L., Esko, J.D., Gabuzda, D., Fiala, M., Trono, D., van der Schueren, B., David, G. & Galloway, P.A. (2004). Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. *J. Virol.* **78**, 6567-6584.
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A. & Bevan, M.D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* **196**, 527-542.
- Bossuet, C., Vaufrey, F., Conde, F., Chretien, F., Pichon, J., Hantraye, P., Le Grand, R., Dormont, D. & Gras, G. (2004). Up-regulation of glutamate concentration in the putamen and in the prefrontal cortex of asymptomatic SIVmac251-infected macaques without major brain involvement. *J. Neurochem.* **88**, 928-938.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Budka, H. (1991). Neuropathology of human immunodeficiency virus infection. *Brain Pathol.* **1**, 163-175.
- Burnette, W.N. (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.

- Burudi, E.M. & Fox, H.S. (2001). Simian immunodeficiency virus model of HIV-induced central nervous system dysfunction. *Adv. Virus Res.* **56**, 435-468.
- Campiani, G., Fattorusso, C., De Angelis, M., Catalanotti, B., Butini, S., Fattorusso, R., Fiorini, I., Nacci, V. & Novellino, E. (2003). Neuronal high-affinity sodium-dependent glutamate transporters (EAATs): targets for the development of novel therapeutics against neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 599-625.
- Chao, C.C. & Lee, E.H. (1999). Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor on dopamine neurons: role of antioxidation. *Neuropharmacology* **38**, 913-916.
- Clements, J.E., Mankowski, J.L., Gama, L. & Zink, C. (2008). The accelerated simian immunodeficiency virus macaque model of human immunodeficiency virus-associated neurological disease: From mechanism to treatment. *J. Neurovirol.* **14**, 309-317.
- Clifford, D.B. (2000). Human immunodeficiency virus-associated dementia. *Arch. Neurol.* **57**, 321-324.
- Colton, C.A. & Gilbert, D.L. (1987). Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* **223**, 284-288.
- Conradt, M. & Stoffel, W. (1997). Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. *J. Neurochem.* **68**, 1244-1251.
- Corona, J.C., Tovar-y-Romo, L.B. & Tapia, R. (2007). Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin. Ther. Targets* **11**, 1415-1428.
- Czub, M., Czub, S., Gosztonyi, G., Koutsilieri, E., Sopper, S., Muller, J.G., Gerlach, M., Riederer, P. & ter Meulen, V. (1999). Effects of selegiline in a retroviral rat model for neurodegenerative disease. *J. Neurovirol.* **5**, 458-464.
- Czub, S., Czub, M., Koutsilieri, E., Sopper, S., Villinger, F., Muller, J.G., Stahl-Henning, C., Riederer, P., ter Meulen, V. & Gosztonyi, G. (2004). Modulation of simian immunodeficiency virus neuropathology by dopaminergic drugs. *Acta Neuropathol.* **107**, 216-226.
- Czub, S., Koutsilieri, E., Sopper, S., Czub, M., Stahl-Hennig, C., Muller, J.G., Pedersen, V., Gsell, W., Heeney, J.L., Gerlach, M., Gosztonyi, G., Riederer, P. & ter Meulen, V. (2001). Enhancement of central nervous system pathology in early simian immunodeficiency virus infection by dopaminergic drugs. *Acta Neuropathol.* **101**, 85-91.
- Czub, S., Müller, J.G., Czub, M. & Müller-Hermelink, H.K. (1996). Nature and sequence of simian immunodeficiency virus-induced central nervous system lesions: a kinetic study. *Acta Neuropathol.* **92**, 487-498.
- Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* **65**, 1-105.

- D'Aversa, T.G., Yu, K.O. & Berman, J.W. (2004). Expression of chemokines by human fetal microglia after treatment with the human immunodeficiency virus type 1 protein Tat. *J. Neurovirol.* **10**, 86-97.
- David, H.N., Anseau, M. & Abraini, J.H. (2005). Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of "intact" animals. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **50**, 336-360.
- Demuth, M., Czub, S., Sauer, U., Koutsilieri, E., Haaft, P., Heeney, J., Stahl-Hennig, C., ter 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**, 187-201.
- Desrosiers, R.C. (1990). The simian immunodeficiency viruses. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 557-578.
- Diamond, J.S. & Jahr, C.E. (1997). Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale. *J. Neurosci.* **17**, 4672-4686.
- Dittmer, U., Luke, W., Stahl-Hennig, C., Hunsmann, G. & Voss, G. (1994). Virus specific helper T cell response of macaques immunized with inactivated whole SIV is not correlated with reactivity against cellular components of vaccine preparation. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **10**, 329-330.
- Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol. Ther.* **81**, 163-221.
- 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), 1249-1253.
- Dringen, R. & Hamprecht, B. (1999). N-acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain. *Neurosci. Lett.* **259**, 79-82.
- Duan, S., Anderson, C.M., Stein, B.A. & Swanson, R.A. (1999). Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J. Neurosci.* **19**, 10193-10200.
- Ellis, R.J., Deutsch, R., Heaton, R.K., Marcotte, T.D., McCutchan, J.A., Nelson, J.A., Abramson, I., Thal, L.J., Atkinson, J.H., Wallace, M.R. & Grant, I. (1997). Neurocognitive impairment is an independent risk factor for death in HIV infection. San Diego HIV Neurobehavioral Research Center Group. *Arch. Neurol.* **54**, 416-424.
- 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), 927-936.

- Fan, M.M. & Raymond, L.A. (2007). N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* **81**, 272-293.
- Fauci, A.S. & Lane, H.C. (2002). Für die deutsche Ausgabe: Bergmann, F., Schürmann, D., Vallée, M., Rotty, J. & Suttrop, N. Die HIV-Erkrankung: AIDS und verwandte Krankheitsbilder. In: Dietel, M., Dudenhausen, J., Suttrop, N. (Hrsg.) *Harrison's Innere Medizin* (S. 2031-2092). Dt. Ausg. der 15. Auflage von Harrison's Principles of Internal Medicine. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag.
- Ferrando, S., van Gorp, W., McElhiney, M., Goggin, K., Sewell, M. & Rabkin, J. (1998). Highly active antiretroviral treatment in HIV infection: benefits for neuropsychological function. *AIDS* **12**, 65-70.
- Fetler, L. & Amigorena, S. (2005). Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* **309**, 392-393.
- Foley, P., Gerlach, M., Youdim, M.B. & Riederer, P. (2000). MAO-B-inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders? *Parkinsonism Relat. Disord.* **6**, 25-47.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* **43**, 1-11.
- Gartner, S. (2000). HIV infection and dementia. *Science* **287**, 602-604.
- Gassen, H.G. & Schimpf, G. (2002). *Gentechnische Methoden* (2.Aufl.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Gegelashvili, G. & Schousboe, A. (1997). High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol.* **52**, 6-15.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y. & Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res. Rev.* **20**, 240-247.
- Gerfen, C. & Wilson, C. (1996). The Basal Ganglia. In T. Hokfelt (ed.), *Integrated systems of the CNS* (Band 12, S. 371-468). Amsterdam: Elsevier.
- Gerlach, M., Reichmann, H., Riederer, P. & Götz, W. (2001). *Die Parkinson-Krankheit, Grundlagen, Klinik, Therapie*. Wien: 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 Res. Hum. Retrov.* **10**, 947-951.
- Glass, J.D., Fedor, H., Wesselingh, S.L. & McArthur, J.C. (1995). Immunocytochemical quantitation of human immunodeficiency virus in the brain: correlations with dementia. *Ann. Neurol.* **38**, 755-762.
- Gonzalez-Scarano, F. & Martin-Garcia, J. (2005). The neuropathogenesis of AIDS. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 69-81.

- Gras, G., Chretien, F., Vallat-Decouvelaere, A.V., Le Pavec, G., Porcheray, F., Bossuet, C., Leone, C., Mialocq, P., Dereuddre-Bosquet, N., Clayette, P., Le Grand, R., Creminon, C., Dormont, D., Rimaniol, A.C. & Gray, F. (2003). Regulated expression of sodium-dependent glutamate transporters and synthetase: a neuroprotective role for activated microglia and macrophages in HIV infection? *Brain Pathol.* **13**, 211-222.
- Guillemin, G.J. & Brew, B.J. (2004). Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 388-397.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M. & Sharp, P.M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**, 607-614.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**, 1609-1623.
- Harrison, M.J.G. & McArthur, J. (1995). HIV associated dementia complex. In J. McArthur (ed.), *AIDS and Neurology* (pp. 31-64). New York: Churchill Livingstone.
- Hassel, B. & Dingledine, R. (2006). Glutamate. In R.D. Price (ed.): *Basic Neurochemistry* (pp. 267-290). New York: Elsevier.
- Hazell, A.S. (2007). Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem. Int.* **50**, 941-953.
- Hernandez, L.F., Segovia, G. & Mora, F. (2003). Effects of activation of NMDA and AMPA glutamate receptors on the extracellular concentrations of dopamine, acetylcholine, and GABA in striatum of the awake rat: a microdialysis study. *Neurochem. Res.* **28**, 1819-1827.
- Heyes, M.P., Ellis, R.J., Ryan, L., Childers, M.E., Grant, I., Wolfson, T., Archibald, S. & Jernigan, T.L. (2001). Elevated cerebrospinal fluid quinolinic acid levels are associated with region-specific cerebral volume loss in HIV infection. *Brain* **124**, 1033-1042.
- Hirsch, V.M. & Johnson, P.R. (1994). Pathogenic diversity of simian immunodeficiency viruses. *Virus Res.* **32**, 183-203.
- Holden, C.P., Haughey, N.J., Nath, A. & Geiger, J.D. (1999). Role of Na⁺/H⁺ exchangers, excitatory amino acid receptors and voltage-operated Ca²⁺ channels in human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated increases in intracellular Ca²⁺ in human neurons and astrocytes. *Neuroscience* **91**, 1369-1378.
- Hwang, J., Zheng, L.T., Ock, J., Lee, M.G., Kim, S.H., Lee, H.W., Lee, W.H., Park, H.C. & Suk, K. (2008). Inhibition of glial inflammatory activation and neurotoxicity by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology* **55**, 826-834.
- Hynd, M.R., Scott, H.L. & Dodd, P.R. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **45**, 583-595.

- Jang, M.H., Jung, S.B., Lee, M.H., Kim, C.J., Oh, Y.T., Kang, I., Kim, J. & Kim, E.H. (2005). Melatonin attenuates amyloid beta 25-35-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. *Neurosci. Lett.* **380**, 26-31.
- Jarabek, B.R., Yasuda, R.P. & Wolfe, B.B. (2004). Regulation of proteins affecting NMDA receptor-induced excitotoxicity in a Huntington's mouse model. *Brain* **127**, 505-516.
- Jensen, J.B., Pickering, D.S. & Schousboe, A. (2000). Depolarization-induced release of [3H]D-aspartate from GABAergic neurons caused by reversal of glutamate transporters. *Int. J. Dev. Neurosci.* **18**, 309-315.
- Jenuwein, M. (2004). *Signaltransduktion im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen*. Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Verfügbar unter: URL: <http://www.opus-bayern.de/uni-wuerzburg/volltexte/2005/1213/>.
- 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 simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J. Neurovirol.* **10**, 163-170.
- Joag, S.V. (2000). Primate models of AIDS. *Microbes Infect.* **2**, 223-229.
- Kalandadze, A., Wu, Y. & Robinson, M.B. (2002). Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxy-terminal domain and partial dependence on serine 486. *J. Biol. Chem.* **277**, 45741-45750.
- Kalivas, P.W. & Duffy, P. (1997). Dopamine regulation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens. *Brain Res.* **761**, 173-177.
- Kaul, M., Garden, G.A. & Lipton, S.A. (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* **410**, 988-994.
- Kieburtz, K.D., Epstein, L.G., Gelbard, H.A. & Greenamyre, J.T. (1991). Excitotoxicity and dopaminergic dysfunction in the acquired immunodeficiency syndrome dementia complex. Therapeutic implications. *Arch. Neurol.* **48**, 1281-1284.
- Kiedrowski, L., Wroblewski, J.T. & Costa, E. (1994). Intracellular sodium concentration in cultured cerebellar granule cells challenged with glutamate. *Mol. Pharmacol.* **45**, 1050-1054.
- Kneitz, S., Meisner, F., Sopper, S., Kaiser, F., Grünblatte, E., Scheller, C., Riederer, P., ter Meulen, V. & Koutsilieri, E. (2007). Biostatistical analysis of gene microarrays reveals diverse expression clusters between macaque subspecies in brain SIV infection. *J. Neural Transm.* **72**, 317-322.
- Kort, J.J. (1998). Impairment of excitatory amino acid transport in astroglial cells infected with the human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **14**, 1329-1339.

- 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 monkeys (*Macaca mulatta*). *AIDS Res. Hum. Retrov.* **15**, 471-477.
- Koutsilieri, E., Sopper, S., Scheller, C., ter Meulen, V. & Riederer, P. (2002a). Involvement of dopamine in the progression of AIDS Dementia Complex. *J. Neural Transm.* **109**, 399-410.
- Koutsilieri, E., Scheller, C., Sopper, S., ter Meulen, V. & Riederer, P. (2002b). Psychiatric complications in human immunodeficiency virus infection. *J. Neurovirol.* **8** (2), 129-133.
- Kramer-Hammerle, S., Rothenaigner, I., Wolff, H., Bell, J.E. & Brack-Werner, R. (2005). Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res.* **111**, 194-213.
- Kugler, P. & Schmitt, A. (1999). Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* **27**, 129-142.
- 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**, 609-621.
- Lackner, A.A., Vogel, P., Ramos, R.A., Kluge, J.D. & Marthas, M. (1994). Early events in tissues during infection with pathogenic (SIVmac239) and nonpathogenic (SIVmac1A11) molecular clones of simian immunodeficiency virus. *Am. J. Pathol.* **145**, 428-439.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259), 680-685.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P. & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **39**, 151-170.
- Lee, S.C., Liu, W., Dickson, D.W., Brosnan, C.F. & Berman, J.W. (1993). Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J. Immunol.* **150**, 2659-2667.
- Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. & Danbolt, N.C. (1995). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* **15**, 1835-1853.
- Letvin, N.L. & King, N.W. (1990). Immunologic and pathologic manifestations of the infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **3**, 1023-1040.
- Lewen, A., Matz, P. & Chan, P.H. (2000). Free radical pathways in CNS injury. *J. Neurotraum.* **17**, 871-890.

- Li, L., Lu, J., Tay, S.S., Moochhala, S.M. & He, B.P. (2007). The function of microglia, either neuroprotection or neurotoxicity, is determined by the equilibrium among factors released from activated microglia in vitro. *Brain Res.* **1159**, 8-17.
- Ling, B., Veazey, R.S., Luckay, A., Penedo, C., Xu, K., Lifson, J.D. & Marx, P.A. (2002). SIV(mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans. *AIDS* **16**, 1489-1496.
- Lipton, S.A. (1994). HIV-related neuronal injury. Potential therapeutic intervention with calcium channel antagonists and NMDA antagonists. *Mol Neurobiol* **8**, 181-196.
- Lipton, S.A. & Gendelman, H.E. (1995). Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Dementia associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *New Engl. J. Med.* **332**, 934-940.
- Liu, B., Gao, H.M., Wang, J.Y., Jeohn, G.H., Cooper, C.L. & Hong, J.S. (2002). Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**, 318-331.
- Luthert, P.J., Montgomery, M.M., Dean, A.F., Cook, R.W., Baskerville, A. & Lantos, P.L. (1995). Hippocampal neuronal atrophy occurs in rhesus macaques following infection with simian immunodeficiency virus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **21**, 529-534.
- Maestroni, G.J. (1999). Therapeutic potential of melatonin in immunodeficiency states, viral diseases, and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **467**, 217-226.
- Mankowski, J.L., Clements, J.E. & Zink, C.M. (2002). Searching for Clues: Tracking the pathogenesis of human immunodeficiency virus central nervous system disease by use of an accelerated, consistent simian immunodeficiency virus macaque model. *J. Infect. Dis.* **186** (suppl. 2), 199-208.
- Manning, M. & Colon, W. (2004). Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. *Biochemistry* **43** (35), 11248-11254.
- Marthas, M.L., Lu, D., Penedo, M.C., Hendrickx, A.G. & Miller, C.J. (2001). Titration of an SIVmac251 stock by vaginal inoculation of Indian and Chinese origin rhesus macaques: transmission efficiency, viral loads, and antibody responses. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **17**, 1455-1466.
- Marvanova, M. & Wong, G. (2004). Adenosine A2A receptor mRNA expression is increased in rat striatum and nucleus accumbens after memantine administration. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **120**, 193-196.
- Masliah, E., Ge, N., Achim, C.L., DeTeresa, R. & Wiley, C.A. (1996). Patterns of neurodegeneration in HIV encephalitis. *J. NeuroAIDS* **1**, 161-173.
- McArthur, J.C. (2004). HIV dementia: an evolving disease. *J. Neuroimmunol.* **157**, 3-10.

- Meisner, F. (2008). *Die Rolle von Dopamin in der Pathogenese der HIV-assoziierten Demenz*. Unveröffentlichte Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg.
- Meisner, F., Neuen-Jacob, E., Sopper, S., Schmidt, M., Schlamme, S., Scheller, C., Vosswinkel, D., ter Meulen, V., Riederer, P. & Koutsilieri, E. (2008). Disruption of amino acid transporters in brains of SIV-infected rhesus macaques is associated with microglia activation. *J. Neurochem.* **104** (1), 202-209.
- Meisner, F., Scheller, C., Kneitz, S., Sopper, S., Neuen-Jacob, E., Riederer, P., ter Meulen, V. & Koutsilieri, E. (2008). Memantine upregulates BDNF and prevents dopamine deficits in SIV-infected macaques: a novel pharmacological action of Memantine. *Neuropsychopharmacology* **33** (9), 2228-2236.
- Meldrum, B.S., Akbar, M.T. & Chapman, A.G. (1999). Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res.* **36**, 189-204.
- Mellgren, A. (2006). *On HIV-1 infection in the central nervous system*. Dissertation, Universität Göteborg.
- 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), 1583-1585.
- Miralles, V.J., Martinez-Lopez, I., Zaragoza, R., Borrás, E., Garcia, C., Pallardo, F.V. & Vina, J. R. (2001). Na⁺ dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. *Brain Res.* **922**, 21-29.
- Mirsattari, S.M., Power, C. & Nath, A. (1998). Parkinsonism with HIV-infection. *Mov. Disord.* **13** (4), 684-689.
- Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J., Miyoshi, K. & Ogawa, N. (2004). Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain Res.* **1029**, 120-123.
- Mollace, V., Nottet, H.S., Clayette, P., Turco, M.C., Muscoli, C., Salvemini, D. & Perno, C.F. (2001). Oxidative stress and neuroAIDS: triggers, modulators and novel antioxidants. *Trends Neurosci.* **24**, 411-416.
- Mora, F., Segovia, G. & Del Arco, A. (2008). Glutamate-dopamine-GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Res. Rev.* **58**, 340-353.
- 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**, 1246-1249.
- Muyderman, H., Wadey, A.L., Nilsson, M. & Sims, N.R. (2007). Mitochondrial glutathione protects against cell death induced by oxidative and nitrative stress in astrocytes. *J. Neurochem.* **102**, 1369-1382.

- Nafia, I., Re, D.B., Masmajan, F., Melon, C., Kachidian, P., Kerkerian-Le Goff, L., Nieoullon, A. & Had-Aissouni, L. (2008). Preferential vulnerability of mesencephalic dopamine neurons to glutamate transporter dysfunction. *J. Neurochem.* **105**, 484-496.
- Nakao, N., Grasbon-Frodl, E.M., Widner, H. & Brundin, P. (1996). Antioxidant treatment protects striatal neurons against excitotoxic insults. *Neuroscience* **73**, 185-200.
- Navia, B.A., Jordan, B.D. & Price, R.W. (1986). The AIDS dementia complex: I. Clinical features. *Ann. Neurol.* **19**, 517-524.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**, 1314-1318.
- Norley, S. & Kurth, R. (1997). Simian immunodeficiency virus as a model of HIV pathogenesis. *Springer Semin. Immun.* **18**, 391-405.
- Nuovo, G.J., Gallery, F., MacConnell, P. & Braun, A. (1994). In situ detection of polymerase chain reaction-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor-alpha RNA in the central nervous system. *Am. J. Pathol.* **144**, 659-666.
- O'Donnell, L.A., Agrawal, A., Jordan-Sciutto, K.L., Dichter, M.A., Lynch, D.R. & Kolson, D.L., (2006). Human immunodeficiency virus (HIV)-induced neurotoxicity: roles for the NMDA receptor subtypes. *J. Neurosci.* **26**, 981-990.
- Oka, S., Kamata, H., Kamata, K., Yagisawa, H. & Hirata, H. (2000). N-acetylcysteine suppresses TNF-induced NF-kappaB activation through inhibition of IkappaB kinases. *FEBS Lett.* **472**, 196-202.
- Okamoto, M., Ono, M. & Baba, M. (2001). Suppression of cytokine production and neural cell death by the anti-inflammatory alkaloid cepharanthine: a potential agent against HIV-1 encephalopathy. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 747-753.
- Olney, J.W. (1978). Neurotoxicity of excitatory amino acids. In P. McGeer (ed.), *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology* (pp. 95-112). New York: Raven Press.
- Orandle, M.S., MacLean, A.G., Sasseville, V.G., Alvarez, X. & Lackner, A.A. (2002). Enhanced expression of proinflammatory cytokines in the central nervous system is associated with neuroinvasion by simian immunodeficiency virus and the development of encephalitis. *J. Virol.* **76**, 5797-5802.
- Pantaleo, G., Graziosi, C. & Fauci, A.S. (1993). The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV-infection. *Semin. Immunol.* **5**, 157-163.
- Paul, R.H., Brickman, A.M., Navia, B., Hinkin, C., Malloy, P.F., Jefferson, A.L., Cohen, R.A., Tate, D.F. & Flanigan, T.P. (2005). Apathy is associated with volume of the nucleus accumbens in patients infected with HIV. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **17**, 167-171.

- Penedo, M.C., Bontrop, R.E., Heijmans, C.M., Otting, N., Noort, R., Rouweler, A.J., de Groot, N., de Groot, N.G., Ward, T. & Doxiadis, G.G. (2005). Microsatellite typing of the rhesus macaque MHC region. *Immunogenetics* **57**, 198-209.
- Pfaffl, M.W. (2004). Real Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* **1**, 92-95.
- Piani, D., Frei, K., Do, K.Q., Cuénod, M. & Fontana, A. (1991). Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci. Lett.* **133**, 159-162.
- Pickering, M., Cumiskey, D. & O'Connor, J.J. (2005). Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp. Physiol.* **90**, 663-670.
- Pitt, D., Werner, P. & Raine, C.S. (2000). Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* **6**, 67-70.
- Pow, D.V. & Barnett, N.L. (2000). Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neurosci. Lett.* **280**, 21-24.
- Price, R.W. (1996). Neurological complications of HIV infection. *Lancet* **348**, 445-452.
- Pulliam, L., Gascon, R., Stubblebine, M., McGuire, D. & McGrath, M.S. (1997). Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *Lancet* **349**, 692-695.
- Qian, L., Xu, Z., Zhang, W., Wilson, B., Hong, J.S. & Flood, P.M. (2007). Sinomenine, a natural dextrorotatory morphinan analog, is anti-inflammatory and neuroprotective through inhibition of microglial NADPH oxidase. *J. Neuroinflamm.* **4**, 23.
- 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**, 165-175.
- Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S. & Mobius, H.J. (2006). A 24-week open-label extension study of memantine in moderate to severe Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **63**, 49-54.
- Renart, J., Reiser, J. & Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. In: *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 3116-3120.
- Reynolds, A., Laurie, C., Mosley, R.L. & Gendelman, H.E. (2007). Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* **82**, 297-325.
- RKI (2009). HIV-Infektionen/AIDS: Jahresbericht 2008. Stand 01.03.2009. *Epidemiol. Bull.* 25.Mai 2009, Nr. 21. Berlin: Robert Koch-Institut.

- Rosenberg, N. & Joliecoeur, P. (1997). Retroviral Pathogenesis. In H. Varmus (Hrsg.), *Retroviruses*: 475-586. New York: CSHL Press, Cold Spring Harbor.
- Rothman, S.M. (1985). The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.* **5**, 1483-1489.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J. & Kuncl, R.W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **38**, 73-84.
- Ryu, J.K. & McLarnon, J.G. (2008). Thalidomide inhibition of perturbed vasculature and glial-derived tumor necrosis factor-alpha in an animal model of inflamed Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Dis.* **29**, 254-266.
- Ryzhova, E.V., Crino, P., Shawver, L., Westmoreland, S.V., Lackner, A.A. & Gonzalez-Scarano, F. (2002). Simian immunodeficiency virus encephalitis: analysis of envelope sequences from individual brain multinucleated giant cells and tissue samples. *Virology* **297**, 57-67.
- Saha, R.N. & Pahan, K. (2003). Tumor necrosis factor-alpha at the crossroads of neuronal life and death during HIV-associated dementia. *J. Neurochem.* **86**, 1057-1071.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, J.S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sauermann, U., Stahl-Hennig, C., Stolte, N., Muhl, T., Krawczak, M., Spring, M., Fuchs, D., Kaup, F.J., Hunsmann, G. & Sopper, S. (2000). Homozygosity for a conserved MHC class II DQ-DRB haplotype is associated with rapid disease progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques: results from a prospective study. *J. Infect. Dis.* **182**, 716-724.
- Sasseville, V.G. & Lackner, A.A. (1997). Neuropathogenesis of simian immunodeficiency virus infection in macaque monkeys. *J. Neurovirol.* **3**, 1-9.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- 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**, 1483-1489.
- Scheller, C., Sopper, S., Jenuwein, M., Neuen-Jacob, E., Tatschner, T., Grunblatt, E., ter Meulen, V., Riederer, P. & Koutsilieri, E. (2005). Early impairment in dopaminergic neurotransmission in brains of SIV-infected rhesus monkeys due to microglia activation. *J. Neurochem.* **95**, 377-387.

- Schifitto, G., Navia, B.A., Yiannoutsos, C.T., Marra, C.M., Chang, L., Ernst, T., Jarvik, J.G., Miller, E.N., Singer, E.J., Ellis, R.J., Kolson, D.L., Simpson, D., Nath, A., Berger, J., Shriver, S.L., Millar, L.L., Colquhoun, D., Lenkinski, R., Gonzalez, R.G. & Lipton, S.A. (2007). Memantine and HIV-associated cognitive impairment: a neuropsychological and proton magnetic resonance spectroscopy study. *AIDS* **21**, 1877-1886.
- Schluter, K., Figiel, M., Rozyczka, J. & Engele, J. (2002). CNS region-specific regulation of glial glutamate transporter expression. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 836-842.
- Schünke, M., Schulte, E. & Schumacher, U. (2009). *Prometheus. LernAtlas der Anatomie. Kopf, Hals und Neuroanatomie* (2., überarb. u. erw. Aufl.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Seilhean, D., Kobayashi, K., He, Y., Uchihara, T., Rosenblum, O., Katlama, C., Bricaire, F., Duyckaerts, C. & Hauw, J.J. (1997). Tumor necrosis factor-alpha, microglia and astrocytes in AIDS dementia complex. *Acta neuropathol.* **93**, 508-517.
- Sharer, L.R. (1994). Neuropathology and pathogenesis of SIV infection in the central nervous system. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* **72**, 133-145.
- Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K. & Uhler, M.D. (eds.). (1999). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (6th ed.). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sippy, B.D., Hofman, F.M., Wallach, D. & Hinton, D.R. (1995). Increased expression of tumor necrosis factor-alpha receptors in the brains of patients with AIDS. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **10**, 511-521.
- Sitcheran, R., Gupta, P., Fisher, P.B. & Baldwin, A.S. (2005). Positive and negative regulation of EAAT2 by NF-kappaB: a role for N-myc in TNFalpha-controlled repression. *Embo. J.* **24**, 510-520.
- 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**, 320-329.
- 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**, 747-766.
- Steiner, J., Haughey, N., Li, W., Venkatesan, A., Anderson, C., Reid, R., Malpica, T., Pocernich, C., Butterfield, D.A. & Nath, A. (2006). Oxidative stress and therapeutic approaches in HIV dementia. *Antioxid. Redox Signal* **8**, 2089-2100.
- Stokes, A.H., Hastings, T.G. & Vrana, K.E. (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J. Neurosci. Res.* **55**, 659-665.

- Strange, K., Emma, F. & Jackson, P.S. (1996). Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am. J. Physiol.* **270**, 711-730.
- Streit, W.J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* **40**, 133-139.
- Suttorp, N., Mielke, M., Kiehl, W. & Stück, B. (Hrsg.). (2004). *Infektionskrankheiten. Verstehen, erkennen, behandeln*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- 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), 705-711.
- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, J., Mizuno, T. & Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J. Biol. Chem.* **281**, 21362-21368.
- Tanaka, J., Ichikawa, R., Watanabe, M., Tanaka, K. & Inoue, Y. (1997). Extrajunctional localization of glutamate transporter EAAT4 at excitatory Purkinje cell synapses. *Neuroreport* **8**, 2461-2464.
- Tang, Y.P., Ma, Y.L., Chao, C.C., Chen, K.Y. & Lee, E.H. (1998). Enhanced glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA expression upon (-)-deprenyl and melatonin treatments. *J. Neurosci. Res.* **53**, 593-604.
- Tarazi, F.I. & Baldessarini, R.J. (1999). Regional localization of dopamine and ionotropic glutamate receptor subtypes in striatolimbic brain regions. *J. Neurosci. Res.* **55**, 401-410.
- Tekin, S. & Cummings, J.L. (2002). Frontal-subcortical neuronal circuits and clinical neuropsychiatry: an update. *J. Psychosom. Res.* **53**, 647-654.
- Thai, D.R. (2002). Excitatory amino acid transporter EAAT-2 in tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **12**, 405-411.
- Tian, G., Lai, L., Guo, H., Lin, Y., Butchbach, M.E., Chang, Y. & Lin, C.L. (2007). Translational control of glial glutamate transporter EAAT2 expression. *J. Biol. Chem.* **282**, 1727-1737.
- Tindall, B. & Cooper, D.A. (1991). Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**, 1-14.
- Towbin, H., Staehlin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.

- Tracey, I., Lane, J., Chang, I., Navia, B., Lackner, A. & Gonzalez, R.G. (1997). 1H magnetic resonance spectroscopy reveals neuronal injury in a simian immunodeficiency virus macaque model. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **15**, 21-27.
- Trepel., M. (2008). *Neuroanatomie. Struktur und Funktion* (4., neu bearb. Aufl.). München: Urban & Fischer Verlag.
- Trichel, A.M., Rajakumar, P.A. & Murphey-Corb, M. (2002). Species-specific variation in SIV disease progression between Chinese and Indian subspecies of rhesus macaque. *J. Med. Primatol.* **31**, 171-178.
- Trujillo, J.R., Jaramillo-Rangel, G., Ortega-Martinez, M., Penalva de Oliveira, A.C., Vidal, J.E., Bryant, J. & Gallo, R.C. (2005). International NeuroAIDS: prospects of HIV-1 associated neurological complications. *Cell Res.* **15**, 962-969.
- Ulvestad, E., Williams, K., Mork, S., Antel, J. & Nyland, H. (1994). Phenotypic differences between human monocytes/macrophages and microglial cells studied in situ and in vitro. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **53**, 492-501.
- UNAIDS (2009). *AIDS epidemic update. December 2009*. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS).
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3** (7): RESEARCH 0034.1-0034.11.
- Visalli, V., Muscoli, C., Sacco, I., Sculco, F., Palma, E., Costa, N., Colica, C., Rotiroti, D. & Mollace, V. (2007). N-acetylcysteine prevents HIV gp120-related damage of human cultured astrocytes: correlation with glutamine synthase function. *BMC Neurosci.* **8**, 106.
- Wallstrom, E., Diener, P., Ljungdahl, A., Khademi, M., Nilsson, C.G. & Olsson, T. (1996). Memantine abrogates neurological deficits, but not CNS inflammation, in Lewis rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurol. Sci.* **137**, 89-96.
- Wang, J.Y., Wen, L.L., Huang, Y.N., Chen, Y.T. & Ku, M.C. (2006). Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Curr. Pharm. Des.* **12**, 3521-3533.
- Wensing, A.M., Vercauteren, J., Vijver, D.A., Albert, J., Poggensee, G., Schmit, J.-C., Struck, D., Vandamme, A.M., Åsjö, C., Balotta, C., Camacho, R., Coughlan, S., Grossman, Z., Horban, A., Kücherer, C., Nielsen, C., Paraskevis, D., Puchhammer-Stöckl, E., Riva, C., Ruiz, L., Salminen, M., Schuurman, R., Sonnerborg, A., Stanojevic, M. & Boucher, C.A. (2006). Transmission of HIV drug resistance in Europe. *XVI International AIDS Conference*. Abstract TUAB0101.

- Wesselingh, S.L., Power, C., Glass, J.D., Tyor, W.R., McArthur, J.C., Farber, J.M., Griffin, J.W. & Griffin, D.E. (1993). Intracerebral cytokine messenger RNA expression in acquired immunodeficiency syndrome dementia. *Ann. Neurol.* **33**, 576-582.
- Wesselingh, S.L., Takahashi, K., Glass, J.D., Tyor, W.R., McArthur, J.C., Griffin, J.W. & Griffin, D.E. (1997). Cellular localization of tumor necrosis factor mRNA in neurological tissue from HIV-infected patients by combined reverse transcriptase/polymerase chain reaction in situ hybridization and immunohistochemistry. *J. Neuroimmunol.* **74**, 1-8.
- 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**, 277-284.
- Wilfried, K., Muller, T., Kruger, R. & Horst, P. (1996). Selegiline stimulates biosynthesis of cytokines interleukin-1 beta and interleukin-6. *Neuroreport* **7**, 2847-2848.
- Williams, R., Bokhari, S., Silverstein, P., Pinson, D., Kumar, A. & Buch, S. (2008). Nonhuman primate models of NeuroAIDS. *J. Neurovirol.* **14**, 292-300.
- Wilt, S.G., Milward, E., Zhou, J.M., Nagasato, K., Patton, H., Rusten, R., Griffin, D.E., O'Connor, M. & Dubois-Dalcq, M. (1995). In vitro evidence for a dual role of tumor necrosis factor-alpha in human immunodeficiency virus type 1 encephalopathy. *Ann. Neurol.* **37**, 381-394.
- Wyatt, R. & Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-1888.
- Xiong, H., McCabe, L., Skifter, D., Monaghan, D.T. & Gendelman, H.E. (2003). Activation of NR1a/NR2b receptors by monocyte-derived macrophage secretory products: implications for human immunodeficiency virus type-one associated dementia. *Neurosci. Lett.* **341**, 246-250.
- Zeevalk, G.D. & Nicklas, W.J. (1992). Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J. Neurochem.* **59**, 1211-1220.
- Zerangue, N. & Kavanaugh, M.P. (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* **383**, 634-637.
- 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**, 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**, 249-259.

- Zink, M.C. & Clements, J.E. (2002). A novel simian immunodeficiency virus model that provides insight into mechanisms of human immunodeficiency virus central nervous system disease. *J. Neurovirol.* **8** (suppl. 2): 42-48.
- Zou, J.Y. & Crews, F.T. (2005). TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Res.* **1034**, 11-24.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Eleni Koutsilieri für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die hervorragende und zuverlässige Betreuung meiner Arbeit danken. Ihr stetes Interesse am Fortschritt meiner Arbeit sowie ihre unermüdliche und gründliche Suche nach Verbesserungen im Arbeitsablauf haben maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Axel Rethwilm danke ich sehr herzlich für die Bereitschaft, die Aufgabe des Korreferats zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Carsten Scheller, der mir im Verlauf der Arbeit immer wieder wertvolle Impulse und Hilfestellungen geben konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. Axel Rethwilm aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie sowie Herrn Prof. Dr. Peter Riederer aus dem Neurochemischen Labor der Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie möchte ich mich für die Bereitstellung meines Laborplatzes bedanken.

Meinem Betreuer Herrn Dipl.-Biol. Falko Meisner gebührt ganz besonderer Dank: ohne seine ausführlichen Versuchsanleitungen und Erklärungen hätte ich mich nie so schnell in die Laborarbeit eingefunden. Er hat sich in kritischen Phasen der Experimente immer sehr viel Zeit genommen, mir auch die kleinsten Tricks und Kniffe der Biologen zu verraten.

Bianca Fries und Ingeborg Euler-König halfen mir stets sehr freundlich und geduldig bei der technischen Umsetzung meiner Experimente.

Miryame Hofmann und Rainer Burger waren mir eine unersetzliche Hilfe beim Herstellen der Homogenate und Bradford-Assays im Neurochemischen Labor der Psychiatrie.

Vor allem Kathrin sowie den anderen Diplomanden und Doktoranden Andrea, Kay, Nicole, Conrad, Uwe, Patrick und Ingolf der Arbeitsgruppe Scheller möchte ich ganz herzlich für die vielen nützlichen Ratschläge und die offene entspannte Arbeitsatmosphäre danken.

Auch Kathleen und Tatiana von der Arbeitsgemeinschaft Rethwilm bin ich sehr dankbar für ihre stete Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Virologie und Immunbiologie sowie allen Mitarbeitern des Neurochemischen Labors für ein angenehmes Arbeitsklima.