Aus der Neurologischen Klinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H.-P. Hartung

Auswirkung von Homocystein und seinen Metaboliten Homocysteinsäure und Homocysteinsulphinsäure auf die neuronale Netzwerkfunktion

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Annika Barbara Hoinkes
2005

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang H.M. Raab
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Mario Siebler
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Bernd Schwahn

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Methionin-/ Homocysteinstoffwechsel und seine Metabolite 1
1.2 Ursachen und Folgen der Hyperhomocysteinämie 3
1.3 Homocystinurie als schwere Form der Hyperhomocysteinämie 5
1.4 Wirkung von Homocystein und Metaboliten auf die neuronale Funktion 6
1.5 Der Neurochip- ein Modellsystem 7
1.6 Fragestellung 8

2 Material und Methoden 10

2.1 Der Mikroelektroden-Array (MEA) 10
2.1.1 Vorbereitung der Mikroelektroden-Arrays 10
2.2 Zellkultur 11
2.2.1 Präparation 11
2.3 MEA-Messstand 12
2.4 Messung spontaner intrinsischer neuronaler Aktivität 13
2.4.1 Messgrößen 13
2.4.2 Akquisition des Spikes 13
2.4.3 Messprotokoll 15
2.5 MEA-Datenakquisition 16
2.6 Datenauswertung und -darstellung 16
2.7 Material 17
2.7.1 Allgemeine Chemikalien 17
2.7.2 Kultur- und Nährmedium 17
2.7.3 Lösung für die elektrophysiologischen Messungen 18

3 Ergebnisse 19

3.1 Änderung der spontanen Spike-Rate neuronaler Netzwerke 19
3.1.1 Reduktion der spontanen Spike-Rate durch L-Methionin 19
3.1.2 Reduktion der spontanen Spike-Rate durch D,L-Homocystein 20
3.1.3 Reduktion der spontanen Spike-Rate durch L-Homocysteinsäure 21
3.1.4 Reduktion der spontanen Spike-Rate durch L-Homocysteinsulphinsäure 22
3.1.5 Additive Reduktion der spontanen Spike-Rate 23
3.2 Änderung des Spike-Musters des neuronalen Netzwerkes 24
3.2.1 L-Methionin hat keinen Einfluss auf die Organisation von Spikes in Bursts 24
3.2.2 D,L-Homocystein führt zu einer Inhibition von Bursts 24

3.2.3 L-HCSA führt zu einer Inhibition von Bursts 24
3.2.4 L-HCA führt zu einer Inhibition von Bursts 27
3.3 Vergleich der spontanen Spike-Rate und der Musteränderung mit NMDA 27
3.4 Der NMDA-Antagonist 2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure (APV) 29
3.4.1 Die Reduktion der SSR durch D,L-Homocystein ist antagonisierbar 29
3.4.2 Die Reduktion der SSR durch L-HCA und L-HCSA ist antagonisierbar 29
3.4.3 Reduktion der spontanen Spike-Rate nach Zugabe von APV zu Methionin 30
4 Diskussion 31
4.1 L-HCSA und L-HCA als relevante Noxen 31
4.2 Die elektrophysiologische Beteiligung von D,L-Homocystein und L-Methionin an der neuronalen Dysfunktion der Hyperhomocysteinämie ist gering 32
4.3 Wirkmechanismus von L-HCSA, L-HCA und D,L-Homocystein 32
4.4 Die zentrale Rolle der exzitatorischen Aminosäuren L-Homocysteinsulphinsäure und L-Homocysteinsäure in der Pathogenese neurologischer Erkrankungen 33
4.5 Die Vitalität von Neuronen bleibt unter dem Einfluss der schwefelhaltigen Aminosäuren erhalten 34
4.6 Der Mikroelektroden-Array – ein gutes Instrument zur Detektion funktioneller Stoffwechselstörungen 35
4.7 Ausblick 37
5 Literaturverzeichnis 38
6 Zusammenfassung 46
7 Lebenslauf 47
8 Danksagung 49

Abkürzungen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet werden:

ACM	Astrozytenkonditioniertes Medium
APV	DL-2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure
ATP	Adenosintriphosphat
Cbl	Cobalamin
CBS	Cystathionin-ß-Synthase
CH_3-THF	N^5-Methyl-Tetrahydrofolat
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
HAM`s F-12	Ernährungsmischlösung F12
HCA	Homocysteinsäure
HCSA	Homocysteinsulphinsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBI	Inter-Burst-Intervall
IC_{50}	halbmaximale inhibitorische Konzentration
ISI	Inter-Spike-Intervall
MEA	Mikroelektroden-Array
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Methioninsynthase
MTHFR	Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDL	Poly-D-Lysin
SSR	Spontane Spike-Rate
TTX	Tetrodotoxin

1 EINLEITUNG

1.1 *Methionin-/ Homocysteinstoffwechsel und seine Metabolite*

Methionin ist eine essenzielle schwefelhaltige Aminosäure. Durch Demethylierung entsteht das ebenfalls schwefelhaltige Homocystein, das in natürlichen Proteinen nicht vorkommt. Auf der Grundlage des Methioninzyklus wird aus Homocystein wieder Methionin zurückgebildet oder es wird irreversibel abgebaut (Abb. 1 u. Abb. 2).

a) b) c)

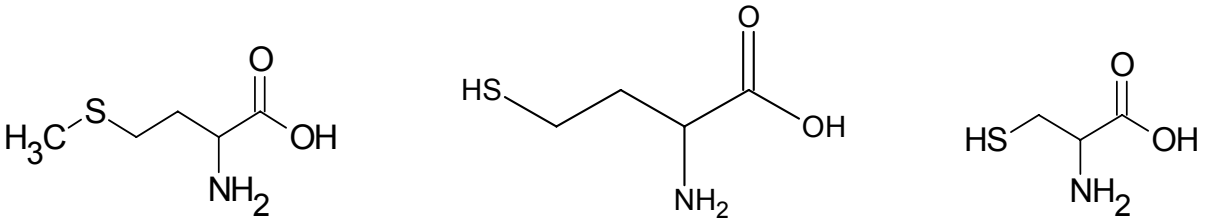

Abb. 1 Strukturformeln der schwefelhaltigen Aminosäuren a) Methionin, b) Homocystein und c) Cystein

In jeder Säugerzelle konkurrieren zwei Reaktionen um das mit der Nahrung aufgenommene Methionin: Auf der einen Seite die Proteinsynthese und auf der anderen Seite die Bildung von S-Adenosylmethionin, dem wichtigsten Methylgruppendonor des Körpers. Nach Übertragung der Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf ein Substrat entsteht S-Adenosylhomocystein, das von einer Hydrolase in Adenosin und das in der vorliegenden Arbeit bedeutsame Homocystein gespalten wird. Homocystein liegt an einer wichtigen Verzweigungsstelle im Stoffwechsel: Es kann entweder durch Remethylierung zu Methionin dem Methioninzyklus erhalten bleiben oder mit Serin zu Cystathionin kondensiert werden und so in den Transsulphurierungspfad zu Cystein eintreten. Beim gesunden Menschen werden etwa 50% des Homocysteins der Transsulphurierung zugeführt. Daneben läuft die Oxidation zu Homocysteinsulphinsäure (HCSA) ab (Abb. 3). Obwohl das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, bislang nicht isoliert werden konnte, kann man von einem analogen Prozess zur Entstehung von Cysteinsulphinsäure aus Cystein durch die Cystein-Dioxygenase ausgehen (Griffith 1987). Homocysteinsäure (HCA) kann auch aus Homocystein durch nicht-enzymatische Oxidation entstehen.

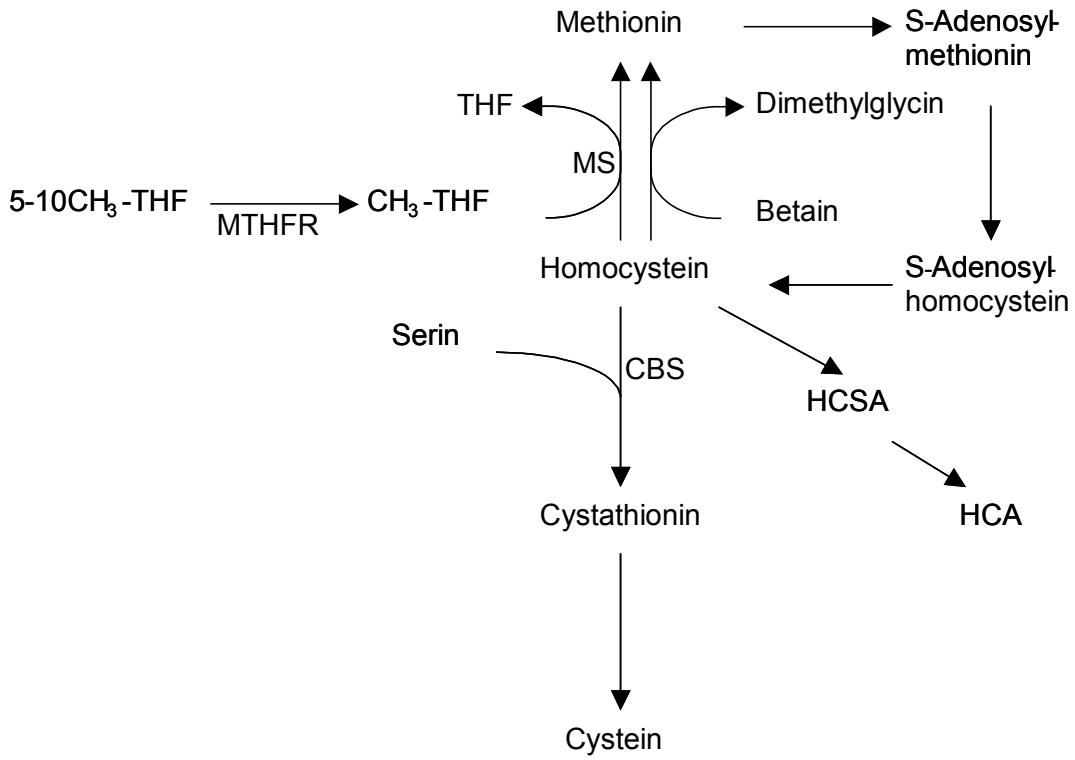

Abb. 2 Methioninstoffwechsel, 3 Sequenzen: Transmethylierung von Methionin zu Homocystein, Remethylierung zu Methionin (MS = Methioninsynthase, MTHFR = Methylentetrahydrofolatreduktase), Transsulphurierung zu Cystein (CBS = Cystathionin-ß-Synthase)

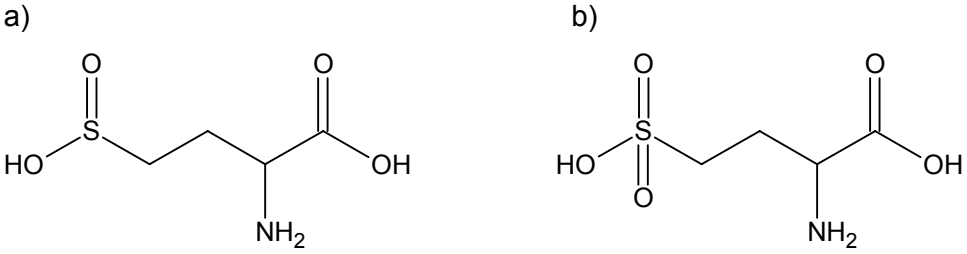

Abb. 3 Strukturformeln der schwefelhaltigen Säuren a) HCSA und b) HCA

Für die Remethylierung stehen zwei Enzyme zur Verfügung: Die Methioninsynthase und die Betain-Homocystein-Methyltransferase. Die Methioninsynthase mit dem Cofaktor Vitamin B_{12} benötigt den Folsäuremetabolit N^5-Methyltetrahydrofolsäure als Methyldonor. Dieser wird durch die Methylentetrahydrofolatreduktasereaktion (MTHFR) in einem weiteren Zyklus bereitgestellt. Über die Methioninsynthasereaktion sind Folsäure- und Vitamin-B_{12}-Stoffwechsel mit dem Methioninstoffwechsel verknüpft.

Die Betain-Homocystein-Methyltransferase verwendet Betain als Methyldonor, das aus dem oxidativen Abbau von Cholin stammt. Im Gegensatz zur ubiquitär vorhandenen Methioninsynthase kommt sie beim Menschen aber nur in Leber und Niere vor. Betain wird

bereits therapeutisch bei bestimmten Homocystinuriepatienten erfolgreich eingesetzt und in aktuellen experimentellen Arbeiten deuten sich weitere Indikationen an (Schwahn et al., 2004(1) und (2)).

Alternativ kann Homocystein in den Transsulphurierungspfad eintreten und so seinem Abbau zugeführt werden. Die Cystathionin-ß-Synthase (CBS) ist das erste Enzym des Transsulphurierungspfades und konkurriert mit den oben genannten Methyltransferasen um das vorhandene Homocystein. Sie ist abhängig von Vitamin-B_6 als Cofaktor und kondensiert Homocystein mit Serin zu Cystathionin. Ein weiteres Vitamin-B_6-abhängiges Enzym stellt die Cystathionase dar, die Cystathionin zu Cystein und α-Ketobutyrat spaltet und damit die Übertragung des Schwefelatoms von Methionin zu Cystein vollendet (Abb. 2).

Die beteiligten Enzyme können genetisch bedingt defekt sein bzw. vermindert exprimiert werden oder vollkommen fehlen. Sie sind abhängig von den genannten Vitaminen und Methylgruppendonatoren. Daraus ergeben sich die verschiedenen Störungen des Methioninstoffwechsels mit dem gemeinsamen Resultat der Hyperhomocysteinämie und Erhöhung der oxidativen Metabolite HCSA und HCA.

1.2 *Ursachen und Folgen der Hyperhomocysteinämie*

Man unterscheidet die seltene schwere Hyperhomocysteinämie von der häufigeren mäßigen und häufigen milden Hyperhomocysteinämie. Die Begriffe sind wie folgt definiert (Malinow 1994):

1. schwere Hyperhomocysteinämie = Homocysteinspiegel > 100 µmol/l
2. mäßige Hyperhomocysteinämie = Homocysteinspiegel 31 – 100 µmol/l
3. milde Hyperhomocysteinämie = Homocysteinspiegel 16 – 30 µmol/l

Letztere findet sich erworben u.a. bei Personen mit ernährungsbedingtem Vitamin B_6-, B_{12}- und Folsäuremangel, besonders häufig in der älteren Bevölkerung, oder auch bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und schwerer Psoriasis. Daneben können die Schlüsselenzyme des Homocysteinstoffwechsels genetisch bedingt leicht verminderte Aktivität aufweisen und so zu erhöhten Homocysteinspiegeln führen. So wurde vor kurzem eine thermolabile Variante der 5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) beschrieben, die sich in manchen Populationen bei ≈ 20% der Menschen findet. Sie beruht auf der homozygoten Mutation C677T in der kodierenden Region der MTHFR. Die Mutation resultiert in einem thermolabilen Enzym, welches nach 5-minütiger Präinkubation des Zellhomogenisates bei 46^0 C mehr als 75% der Ausgangsaktivität verliert (Kang et al., 1988; Frosst et al., 1995; Ueland et al., 2001).

Die schwere Hyperhomocysteinämie wird am häufigsten verursacht durch angeborene Gendefekte der Cystathionin-ß-Synthase. Allein für dieses Enzym wurden von Kraus et al.

(1999) 92 verschiedene Mutationen beschrieben. Bei heterozygoten Mutationen wird nur eine milde Hyperhomocysteinämie nach Methioninbelastung beobachtet.

Neben dem Cystathionin-ß-Synthase-Defekt führen auch Gendefekte im Folsäure- und Vitamin B_{12}- Stoffwechsel zu schwerer Hyperhomocysteinämie. Sie werden mit dem Methioninsynthasedefekt zu den Remethylierungsdefekten zusammengefasst. Ihnen gemeinsam ist die gestörte Methioninsynthese, so dass sich Homocystein nach Erschöpfung des Transsulphurierungspfades anhäuft. Die häufigste Störung im Folsäurestoffwechsel ist eine defekte 5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase. Auch unter Methotrexattherapie bzw. antiproliferativer und antimikrobieller Therapie sind Erhöhungen des Homocysteinspiegels gemessen worden, die sich durch eine funktionelle Störung im Folsäurestoffwechsel erklären lassen (Refsum et al., 1986, Kishi et al., 2003, Schwahn et al., 2005).
Eine weitere Ursache für Hyperhomocysteinämie betrifft das Vitamin B_{12}: Bei Störungen in der Umwandlung der Nahrungsformen zum intrazellulär aktiven Coenzym kommt es zu stark beeinträchtigter Enzymfunktion der Vitamin B_{12}-abhängigen Methioninsynthase. Beispiele solcher Störungen sind Malabsorption des Vitamins bei Intrinsic Faktor-Mangel, Transportproteindefekte (z.B. Transcobalamin für den Vitamintransport im Blut) oder Defekte in der zellulären Aufnahme, intrazellulären Freisetzung und Verteilung von Vitamin B_{12}.
Zusammengefasst unterscheidet man folgende Formen:

1.) Defekt der Cystathionin-ß-Synthase (CBS), deren Cofaktor Vitamin B_6 darstellt.
2.) N- 5,10 Methylentetrahydrofolat-Reduktase-Mangel /-Thermolabilität (MTHFR). Das Enzym stellt N^5-Methyltetrahydrofolat (CH_3-THF) für die Homocysteinremethylierung bereit.
3.) Defekt der Methioninsynthase = N^5–Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyltransferase (sehr selten),die Vitamin B_{12} (Methylcobalamin) als Cofaktor benötigt.
4.) Störungen im Vitamin B_{12} Metabolismus bzw. der Vitamin B_{12} Aufnahme, die sich auf die Aktivität der Methioninsynthase auswirken (cbl C-,D-,E-,F-,G-Mutationen).
5.) Folge einer Grundkrankheit (z.B. Niereninsuffizienz) bzw. Therapiefolge (Methotrexat).
6.) Vitaminmangelernährung

Die milde Hyperhomocysteinämie ist wie der arterielle Hypertonus und die Dyslipoproteinämie ein allgemein akzeptierter unabhängiger Risikofaktor für Gefäßerkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall (Marinou et al., 2005; Ueland et al., 1989) und steht in engem Zusammenhang mit vaskulärer Demenz und dem Morbus Alzheimer (Clarke et al., 1998). Die kognitive Störung der Patienten lässt sich aber nicht

allein auf strukturelle Veränderungen wie Multiinfarktdemenz oder Hirnatrophie zurückführen, sondern erklärt sich auch durch funktionelle Aspekte (Riggs et al., 1996; Morris et al., 2001).
In ihrer schweren Form manifestiert sich Hyperhomocysteinämie bereits im frühen Kindesalter mit dem Krankheitsbild der Homocystinurie.

1.3 *Homocystinurie als schwere Form der Hyperhomocysteinämie*

Stoffwechselstörungen mit neurologischen Manifestationen sind relevante Erkrankungen des klinisch-pädiatrischen Alltags. Die Assoziation von mentaler Retardierung mit auffälliger Aminosäureausscheidung im Urin führte im 20. Jahrhundert zur Beschreibung einer erheblichen Zahl erblicher enzymatischer Defekte, darunter die Phenylketonurie, Ahornsirupkrankheit, Hartnup-Erkrankung, Cystathioninurie und Glycinurie. Zu dieser Gruppe gehört auch die Homocystinurie, eine uneinheitliche Enzymopathie des Methioninstoffwechsels.
Die Homocystinurie wurde unabhängig voneinander von Gerritsen et al. (1962) in Madison, Wisconsin und von Carson und Neill (1962) in Belfast, Nordirland erstmals beschrieben. Beide Patientengruppen wurden aufgrund von mentaler Retardierung untersucht. Aufgrund des äußeren Erscheinungsbildes der hochwüchsigen, schlanken Patienten mit Arachnodaktylie und Linsenluxation ist das Marfan-Syndrom eine wichtige Differentialdiagnose. Es kann darüber hinaus zu akuter neurologischer Symptomatik mit Krampfanfällen und Psychose kommen.
Die Homocystinurie ist die zweithäufigste Ursache einer metabolischen Enzephalopathie nach der Phenylketonurie. Die weltweite Inzidenz liegt zwischen 1:60000 und 1:300000 mit großen Unterschieden zwischen den Ländern (1:50000 in Irland und 1:1000000 in Japan) (Le Syndicat National des Ophthalmologistes de France, 2001).

Das Risiko, eine Manifestation der Erkrankung zu erleiden, steigt mit zunehmendem Alter und damit assoziiert der Einwirkungsdauer von erhöhten Metabolitspiegeln. Die Homocystinurie manifestiert sich im Gegensatz zur Ahornsirupkrankheit noch nicht in den ersten Lebenstagen, die betroffenen Neugeborenen sind zunächst unauffällig. Als erstes Symptom zeigt sich häufig ein Entwicklungsrückstand im ersten oder zweiten Lebensjahr, der bereits auf die geistige Behinderung schließen lässt. Die schwere Hyperhomocysteinämie führt zu einem durchschnittlichen Intelligenzquotienten von 64 bei nicht vom Neugeborenenalter an behandelten Patienten, abhängig von einer eventuellen Restaktivität und dem betroffenen Enzymdefekt (Mudd et al., 1985). Weitere neurologische Symptome sind häufig psychiatrische Störungen und seltener zerebrale Krampfanfälle und extrapyramidale Störungen. Trotz ausgeprägter extrapyramidaler Dysfunktion bei spätbehandelten Homocystinuriepatienten wurden in kernspintomographischen

Untersuchungen keine Auffälligkeiten der Basalganglien gefunden, was entweder für eine pharmakologische Genese der Symptome spricht (Ludolph et al., 1991) oder - wie auch beim Parkinsonsyndrom- für eine zelluläre spezifische Degeneration in kleinen Netzwerken. Wie die Homocystinurie zu den neurologischen Manifestationen führt, konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden. Bei einer Patientin mit Cystathionin-ß-Synthase-Defekt, die ihre Diät nicht einhielt und unter Betainbehandlung stand, wurde im Rahmen einer metabolischen Dekompensation kernspintomographisch ein massives, diffuses zerebrales Ödem nachgewiesen, das sich nach erfolgreicher Therapie innerhalb von kurzer Zeit komplett zurückbildete (Yaghmai et al., 2002). Morphologische Veränderungen an Neuronen, die der metabolischen Störung direkt zuzuschreiben sind, sind bisher nicht beschrieben worden. Im Alter von 2 bis 10 Jahren tritt eine Linsenektopie der Augen auf. Das Skelettsystem ist ebenfalls betroffen: Als häufigste pathologische Veränderung findet sich eine Osteoporose, die bei mindestens 50 Prozent der Patienten am Ende der zweiten Lebensdekade vorhanden ist. Ein wichtiger Grund für Morbidität und die häufigste Todesursache ist die Thromboembolie im Gefäßsystem. Bis zu einem Viertel der Homocystinuriepatienten hat im Alter von 15 Jahren bereits eine Thromboembolie erlitten. Unbehandelt verstirbt die Hälfte der betroffenen Kinder bis zum 25. Lebensjahr, es wurde auch schon von Todesfällen im ersten Lebensjahr berichtet (American Academy of Pediatrics, 1996).

1.4 *Wirkung von Homocystein und Metaboliten auf die neuronale Funktion*

In zahlreichen früheren Arbeiten wurde versucht, die kognitive Dysfunktion von Patienten durch mögliche Wirkmechanismen von Homocystein und seinen Metaboliten zu erklären. Homocystein und seine Metabolite sind Agonisten für ionotrope und einige metabotrope Glutamatrezeptoren. In Experimenten wird meist D,L-Homocystein verwendet, da L-Homocystein nicht käuflich zu erwerben ist und man davon ausgeht, dass nur die L-Form aktiv ist.

Sprince et al. (1969) gelang die Auslösung von tonisch-klonischen Krampfanfällen vom Grand-mal Typ nach intraperitonealer Verabreichung von DL-Homocystein in hoher Dosierung bei Ratten.

Wuerthele et al. (1982) untersuchten bereits die direkte Wirkung von D,L-Homocystein auf kortikale Neurone und fanden einen dosisabhängigen vorwiegend exzitatorischen Effekt, vergleichbar mit dem von Glutamat, der als rezeptorvermittelt interpretiert wurde.

Es ist bekannt, dass D,L-Homocystein, L-HCA und L-HCSA NMDA-agonistische Wirkung zeigen (Herrling et al., 1989; Lipton et al., 1997; Flott-Rahmel et al., 1998; Folbergrova et al., 1997). Durch Homocysteinsäure induzierte generalisierte Krampfanfälle können sowohl

durch NMDA- als auch Non-NMDA-Antagonisten abgeschwächt werden (Folbergrova et al., 2000).

Shi et al. (2003) demonstrierten die agonistische Aktivität von HCA und HCSA an allen drei Klassen metabotroper Glutamatrezeptoren, wobei L-Homocysteinsulphinsäure am potentesten war. Es konnte gezeigt werden, dass homocysteininduzierte Neurotoxizität sowohl über NMDA- als auch über Gruppe-1-metabotrope Glutamatrezeptoren vermittelt wird (Zieminska et al., 2003). Streck et al. (2002) induzierten chronische Hyperhomocysteinämie in vivo und demonstrierten folglich die Hemmung der Na^+,-K^+-ATPase in Rattenhirnen- eine Wirkung, die auch zu der beobachteten kognitiven Störung beitragen könnte, da das Enzym für die normale Hirnfunktion wichtig ist.

1.5 *Der Neurochip- ein Modellsystem zur Untersuchung neuronaler Netzwerkfunktion*

Die Erfordernis, Umweltschadstoffe, medizinisch relevante Metabolite, pharmakologische Substanzen u.a. charakterisieren zu müssen, führte zu der Entwicklung differenzierter Messsysteme. Ein chemischer Indikator kann nicht für alle Substanzen den analytischen Anforderungen gerecht werden (Camman, 1992). Biosensoren sind entwickelt worden und haben den Kreis der Nachweismethoden erweitert. Dissoziierte Neurone verschiedener Regionen des zentralen Nervensystems sind allgemein akzeptierte In-vitro-Modelle, welche die Untersuchung wichtiger neurobiologischer Mechanismen unter kontrollierten Bedingungen erlauben. Mit Hilfe ihrer innovativen Patch-Clamp-Technik beschrieben Sakmann und Neher (1984) als erste Einzelkanaleigenschaften erregbarer Membranen. Neben der Untersuchung von Einzelneuronen, ist die Analyse ihrer Aktivität in kleinen neuronalen Netzwerken ein vielversprechender Schritt nach vorn, um die Funktion von Netzwerken innerhalb des zentralen Nervensystems zu verstehen. Neuronale Netzwerke sind an sich nicht-lineare dynamische Systeme, die komplexe elektrophysiologische Muster durch schnelle Kommunikation zwischen den Neuronen des Netzwerkes hervorbringen. Im Tier sind diese Gewebe fähig, eine beachtliche Diskriminierungsleistung zu erbringen. Tiere können jedoch für eine Vielzahl von Applikationen und kontinuierliches Online-Monitoring nicht eingesetzt werden. Die Rekonstruktion eines Sensorsystems in vitro ist daher ein attraktives Konzept. Mikroelektroden-Arrays erscheinen sehr geeignet für die Untersuchung neuronaler Netzwerke (Gross et al., 1995; Streit et al., 2001; Jimbo et al., 2000; Egert et al., 1998; Maher et al., 1999; Potter et DeMarse, 2001; Keefer et al., 2001; Zeck & Fromherz, 2001; Otto et al., 2003, Legrand et al., 2004). Neurone können in Zellkultur auf Mikroelektroden-Arrays wachsen, welche die simultane Überwachung der Spike-Aktivität vieler Neurone erlauben. Diese Mikroelektroden-Arrays überwachen die spontane oder stimulierte elektrische Aktivität erregbarer Zellen und ermöglichen die Beschreibung von

Wirkungen neuroaktiver Substanzen (Pancrazio et al., 2001 und 2003; O`Shaughnessy et al., 2003). Die Methode nutzt die spontane neuronale Netzwerkaktivität, hervorgebracht durch die Neuronenkultur, als Basis von der aus eine große Aktivitätsänderung als Ereignisnachweis gilt. Neurone sind homöostatische Systeme, die kontinuierlich Moleküle regenerieren und können daher als „erneuerbare Rezeptorplattform“ betrachtet werden. Ein solches neuronales Netzwerk sollte Zuverlässigkeit und größere Reproduzierbarkeit bieten. In der vorliegenden Arbeit wurden die elektrophysiologischen Messungen mit Hilfe von Mikroelektroden-Arrays (MEAs) durchgeführt, auf denen sich ein neuronales Netzwerk ausgebildet hatte (Neurochips). Als Messparameter diente die Änderung der spontanen Netzwerkaktivität nach Substanzapplikation.

1.6 *Fragestellung*

Homocystein, Methionin, HCA und HCSA sind bei der Homocystinurie deutlich erhöht und es findet sich eine dauerhafte mentale Retardierung. Der Plasmahomocysteinspiegel liegt bei Gesunden bei ca. 10 µmol/l, Patienten mit Homocystinurie können 140 µmol/l Homocystein teilweise überschreiten. L-HCA-Spiegel sind in dem Bereich zwischen 1,5 µmol/l L-HCA bei Gesunden bis zu 8,6 µmol/l L-HCA im Plasma von Homocystinuriepatienten anzusiedeln (Lubec et al., 1996; Fritzer-Szekeres et al., 1998). Die Normalwerte für L-HCSA im menschlichen Serum betragen 0,18 nmol/l (Santosh-Kumar et al., 1994). Für Patienten mit Hyperhomocysteinämie liegen keine Zahlen vor, nach allgemeiner Einschätzung liegen sie aber in einem ähnlichen Bereich, wie er für L-HCA genannt wurde.

Auch die milde Erhöhung von Homocystein ist mit demenziellen Erkrankungsbildern assoziiert (Seshadri et al., 2002). Demenzpatienten zeigen typischerweise einen Homocysteinspiegel zwischen 15 und 30 µmol/l.
Folgende Fragen sollen mit dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Welche der Substanzen hat einen Effekt auf die neuronale Netzwerkfunktion in vitro? In welchen Konzentrationsbereichen beeinflussen die Substanzen die neuronale Netzwerkfunktion?
2. Lassen sich Rückschlüsse ziehen auf einen möglichen Wirkmechanismus, über den die neuronale Netzwerkfunktion moduliert wird?

Als Modell wurden primär dissoziierte Cortexneurone der embryonalen Ratte auf dem Mikroelektroden-Array verwendet, wo sie ein spontan aktives Netzwerk ausbildeten. Der Mikroelektroden-Array ermöglicht die Messung sowohl von neuronaler Erregbarkeit als auch synaptischer Übertragung. So ist er als sensitiver Biosensor auf Zellbasis breit einsetzbar.

Ein neuer Aspekt dieser Methode gegenüber Einzelzellmessungen (z.B. Patch Clamp) liegt vor allem in der Erfassung von funktionellen Änderungen durch die Applikation von Substanzen auf der Netzwerkebene.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 *Der Mikroelektroden-Array (MEA)*

In der vorliegenden Arbeit wurden Mikroelektroden-Arrays (MEAs) zur Ableitung neuronaler Aktivität verwendet (Multi Channel Systems, Reutlingen). Sie bestehen aus 5*5 cm großen Glasträgern mit 60 Titaniumnitrid-Elektroden im Zentrum, die über goldene Leitungsbahnen mit den äußeren Leitungsfeldern in Verbindung stehen, isoliert mit einer Siliziumnitridschicht. Die Elektroden (Durchmesser 30 µm) im Abstand von 200 µm bestehen aus Tausenden von Titaniumnitridsäulen (Durchmesser um 0.1 µm) identischer Höhe (Abb. 4). Diese Mikrostruktur vergrößert die Elektrodenoberfläche drastisch und führt so zu einer Reduktion des Widerstandes (80 - 250 kΩ) im Vergleich zu flachen Goldelektroden. Dadurch ist die Qualität der Ladungsübertragung stark verbessert worden. Um eine Zellkulturkammer einzurichten wurde ein Glasring von 12 mm Höhe und 20 mm Durchmesser mit Silikonkleber auf dem MEA befestigt (Abb. 4).

a) b)

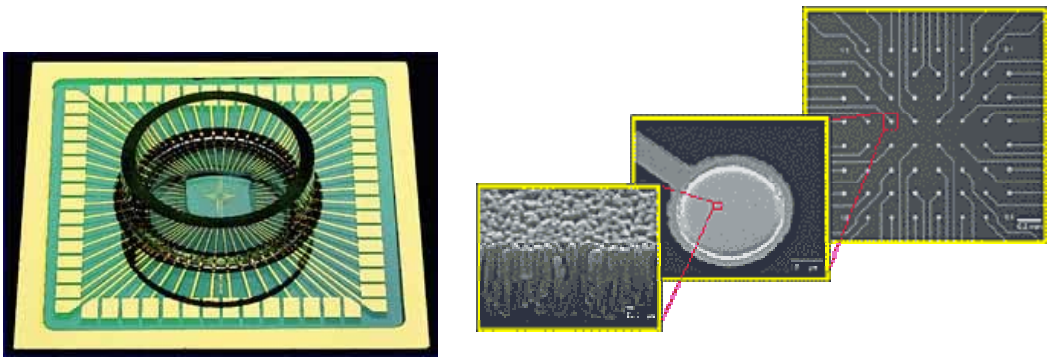

Abb. 4: Mikroelektroden-Array mit Elektroden, a) makroskopische Ansicht, b) mikroskopische Ansicht (Multi Channel Systems, Reutlingen)

2.1.1 Vorbereitung der Mikroelektroden-Arrays

Vor ihrem Einsatz wurden die mehrfach verwendbaren Mikroelektroden-Arrays (MEAs) in detergentienhaltiger Lösung (BM-Lösung 3%, BioMed, München) für 5 Minuten im Ultraschallbad gereinigt und im Folgenden eine Stunde lang durch Methanol sterilisiert. Im Abstand von 24 Stunden wurde zuerst mit Poly-D-Lysin (1 mg/ml) und dann mit Laminin (13 µg/ml) beschichtet. Poly-D-Lysin verbessert die Haftung von Laminin auf den Glasträgern, das wiederum die Ausbildung axonaler Verknüpfungen fördert. Vor Aussaat der Cortexneurone wurde serumfreies N2-Medium in die MEAs gegeben, das vorher von einer dissoziierten Astrozytenkultur neugeborener Ratten für mindestens 24 Stunden konditioniert worden war (ACM = Astrozytenkonditioniertes Medium). Die Astrozyten schleusen in dieser

Zeit Wachstums- und Differenzierungsfaktoren aus, die die Differenzierung der Neurone verbessern.

2.2 *Zellkultur*

Für die elektrophysiologischen Messungen wurden primär dissoziierte Zellkulturen aus Cortexpräparationen von embryonalen Wistar-Ratten verwendet. Die Ratten wurden aus der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen.

2.2.1 Präparation

Am 15. Embryonaltag erfolgte die Gewebeentnahme. Zu diesem Zeitpunkt teilen sich die Neurone nicht mehr, aber sie differenzieren noch weiter aus (Bayer und Altmann, 1990, Dichter, 1978).

Trächtige Ratten wurden mit Äther narkotisiert, getötet und die Föten steril entnommen. Nach Dekapitation wurde der Schädel eröffnet und das Gehirn entfernt, das im Folgenden von den Meningen befreit wurde. Der Cortex wurde von den umgebenden Hirnregionen abgetrennt und in Kulturmedium aufgenommen. Durch eine 8-minütige Inkubationszeit mit Trypsin / EDTA-Lösung bei 37°C löste sich der Gewebeverband. Die Proteaseaktivität wurde mit 10% FCS geblockt und die Zellsuspension anschließend zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden mit einer ausgezogenen Pasteurpipette aufgenommen und die Zellsuspension durch Gaze mit einer Porengröße von 30 µm filtriert.

Vor der Aussaat erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl nach Trypanblaufärbung in einer Thomazählkammer. Die Suspension wurde mit ACM so verdünnt, dass die Aussaat zu einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen pro cm^2 führte.

Die dissoziierten Neurone wurden auf Mikroelektroden-Arrays (MEAs) ausgesät und dann im Brutschrank bei 37^0C in einer wassergesättigten Atmosphäre (10% $C0_2$ / 90% Luft) inkubiert. Antibiotika oder Antimitotika wurden nicht hinzugesetzt. Bereits nach einigen Stunden begann das Auswachsen von Neuriten und innerhalb von wenigen Tagen bildete sich ein dichtes axonales Netzwerk (Abb. 5).

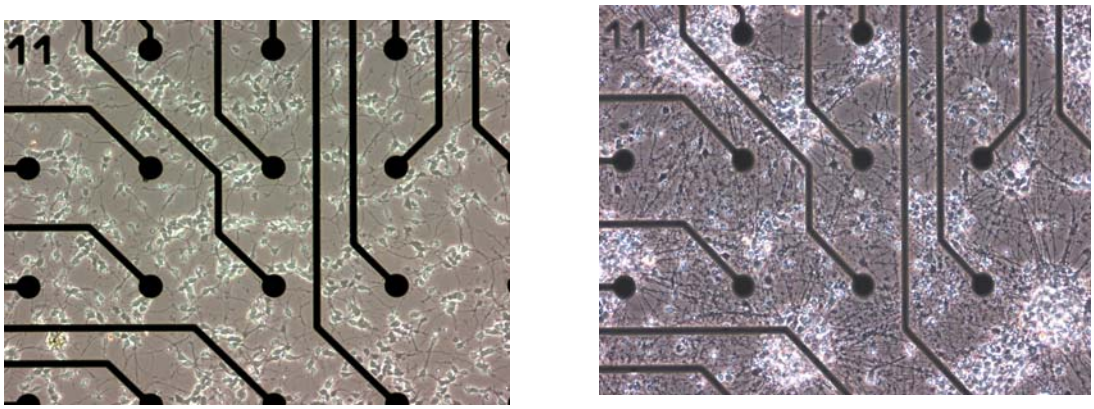

Abb. 5: Lichtmikroskopische Ansicht des neuronalen Netzwerkes auf dem MEA, links an Tag 2, rechts an Tag 8 nach der Aussaat

2.3 *MEA-Messstand*

Zur Messung wurde der MEA in das zweiteilige Verstärkersystem (Multi Channel Systems, Reutlingen) eingespannt (Abb. 6). Die Bodenplatte trug eine Wärmeplatte mit integriertem Temperatursensor. Über eine externe Temperaturkontrolleinheit (Gefran 800, Provaglio d`Iseo, Spanien) ließ sich der Sollwert einstellen. Die Adjustierung der Temperatur der Messlösungen auf 37^0 C erfolgte in weniger als einer Minute. Die Deckplatte trug am inneren Rand Messfühlerstifte mit Kontakt zu Vorverstärkern. Beim Absenken der Deckplatte kamen diese Stifte in Kontakt mit den Leitungsfeldern auf dem MEA. Um die Vitalität der Zellkultur jederzeit optisch kontrollieren zu können, war das MEA-Messsystem auf dem Tisch eines inversen Phasenkontrastmikroskops (IX 50 Olympus, Tokio, Japan) gelagert. Die Gewebe- und Aufnahmeebene blieb durch ein Loch in der unten gelegenen Heizplatte für mikroskopische Beurteilung zugänglich. Das gesamte Messsystem war auf einem erschütterungsarmen Tisch mit Druckluftfederung gelagert.

Abb. 6: Verstärker / Temperaturkontrolleinheit (Multi Channel Systems, Reutlingen)

2.4 *Messung spontaner intrinsischer neuronaler Aktivität*

5 bis 13 Tage alte dissoziierte Kulturen embryonaler Cortexneurone bildeten synaptisch verknüpfte Netzwerke aus. Diese sind spontan aktiv und feuern Aktionspotentiale, die registriert werden können. Das MEA-System erlaubt die extrazelluläre Ableitung von Aktionspotentialen (Spikes) simultan an 60 Stellen eines neuronalen Netzwerkes (Egert et al., 1998).

Vor dem eigentlichen Experiment wurden die MEAs einer Präparation unter Nährmedium auf Aktivität gescreent und die aktivste Kultur ausgewählt. Für die Messungen wurde das Nährmedium durch magnesiumfreie Badlösung ersetzt. Durch Verminderung der Magnesiumkonzentration wird der magnesiumabhängige Block der NMDA-Rezeptor-Kanäle aufgehoben, was zu einer Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit führt (Mayer und Westbrook, 1988; Nowak et al., 1984), so dass regelmäßige hochfrequente Phasen mit Aktionspotentialen auftreten. Aufgrund des periodischen, synchronisierten Burst-Musters und der Stabilität der Aktivität bewährte sich magnesiumfreie Badlösung für die Testung der Substanzen (Robinson et al., 1993). Im Vergleich zu astrozytenkonditioniertem Medium (ACM) gestattete sie außerdem eine zuverlässige Normierung, da alle Inhaltsstoffe bekannt und durch eine unbegrenzt verfügbare Menge für alle Messungen identisch waren. ACM ist aufgrund der Abstammung von verschiedenen Tieren, unterschiedlichen Alters der Kulturen und limitierter Menge nie genau definiert.

2.4.1 Messgrößen

Die Aktionspotentialfrequenz (Spike-Rate) und die Frequenz von Aktionspotentialclustern (Burst-Rate) werden im Folgenden als Messgrößen für die Untersuchung des Einflusses von Homocystein und seinen Metaboliten auf die neuronale Netzwerkfunktion genutzt. Für die Messungen wurden nur Kulturen eingesetzt, die Spike-Aktivität auf mindestens 5 räumlich getrennten Elektroden zeigten und eine spontane Spike-Rate von mehr als 15 Spikes pro Minute aufwiesen.

2.4.2 Akquisition des Spikes

Die Schwelle der Spike-Erkennung wurde für jeden Kanal (= Elektrode) einzeln bestimmt. Sie war definiert als 8 Standardabweichungen der durchschnittlichen Rauschamplitude während einer 10-prozentigen Lernphase zu Beginn jeder Messung.

Die auf diese Weise ermittelten Schwellenwerte lagen im Bereich von 15 - 20 µV. Es wurden nur Spikes detektiert, die höchstens 2 ms breit waren und deren Abstand vom vorherigen Spike eine Totzeit von 4 ms nicht unterschritt.

Signalausschnitte der detektierten Spikes (1 ms vor, 2 ms nach dem Spike) wurden gespeichert und optisch kontrolliert, um Artefakte auszuschließen. Die Burst-Erkennung beruhte auf dem Vergleich der tatsächlich in einem „spike-train“ auftretenden Inter-Spike-Intervalle (ISIs) mit den theoretisch auf Grund eines Poisson-Prozesses zu erwartenden ISIs. Zunächst wurde für jeden Kanal die mittlere Feuerrate als Inverses des mittleren Inter-Spike-Intervalls berechnet und dann die geordnete Menge der Spikes durchsucht, bis zwei aufeinanderfolgende Spikes weniger als den halben mittleren ISI-Abstand hatten. Danach wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass diese und der folgende Spike von einem Poisson-Prozess mit der mittleren Feuerrate des jeweiligen Kanals generiert worden wären und die zugehörige Entropie bestimmt.
Das Hinzufügen von Spikes führte schließlich zu einer Abnahme oder Konstanz des Informationsmaßes Entropie. Zum Schluss wurden solange am Anfang des so definierten Bursts Spikes entfernt, wie das Informationsmaß durch diese Prozedur zunahm. Die verbleibende Menge benachbarter Spikes bildete dann den Burst. So wurde mit allen Kanälen verfahren, auf denen sich Spikes fanden.
EntroBurst™ verwendete zwei unabhängige Parameter:
Minimale Entropie: Mindest-Entropie eines Tripels von Spikes, damit es als Kandidat für einen Burst angesehen wurde (Voreinstellung 5,00).

Toleranz bei Burst-Ende: Damit ein Burst mit initial sehr hoher Feuerrate (und damit auch hoher Entropie) nicht "vorschnell" beendet wurde, wenn die instantane Feuerrate geringfügig abnahm, erlaubte man am "prospektiven" Ende des Bursts eine Abnahme der Entropie um einen einstellbaren Toleranz-Faktor, keinesfalls aber unter die eingestellte minimale Entropie. (Voreinstellung 0,90: bei Hinzunahme eines Spikes durfte die Entropie um 10% absinken, falls sie noch oberhalb des eingestellten Minimums war). Gespeichert wurden für jeden Burst die Anzahl Spikes, Anfangs- und Endzeitpunkt.

Die Bursts wurden ebenfalls optisch auf Plausibilität geprüft. Interburst-Intervalle wurden jeweils vom ersten Spike des ersten Bursts bis zum ersten Spike des nächsten Bursts angegeben.
Für die Untersuchung, ob die Testsubstanzen neben der Änderung der Gesamtzahl der Spikes auch eine Änderung der raum-zeitlichen Struktur der Aktivität (Spikes gruppiert in Bursts) bewirken, wurde der Messzeitraum in kleine Zeitabschnitte (BINs) unterteilt. Mit Hilfe eines Analyseprogramms, auf der Grundlage leerer und mit Spikes gefüllter BINs, konnte die während der laufenden Messung beobachtete Musteränderung objektiviert werden. Um Musteränderungen auf Grund von Substanzwirkungen zu quantifizieren, wurde der Anteil von Spikes in Bursts an der Gesamtaktivität jedes Kanals bestimmt. Dabei wurden nur

Kanäle ausgewertet, deren Gesamtzahl Spikes 20 überschritt, und eine minimale Gesamtaktivität von 20% der Aktivität des aktivsten Kanals wurde vorausgesetzt. Verwendet wurden Messungen bei Konzentrationen in der Nähe der IC_{50}. Teilweise zeigten diese Messungen allerdings bereits eine deutlich reduzierte Gesamtaktivität, so dass die Anzahl bezüglich des Anteils von Spikes in Bursts auswertbarer Messungen kleiner war. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden über unabhängige Kanäle berechnet.

2.4.3 Messprotokoll

Die Kulturkammer auf dem MEA bot ausreichend Raum für einen Milliliter der in Standardbadlösung gelösten Testsubstanz, die für fünf Minuten eingebracht wurde.

Zur Testung der Substanzwirkungen wurde zunächst die neuronale Aktivität (Spike- und Burst-Rate) unter Standardbadlösung und danach die Aktivität unter Inkubation mit der jeweiligen Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen gemessen (Abb. 7). Nachdem die Substanz in einer bestimmten Konzentration eingebracht war, wurde die Netzwerkaktivität eine Minute lang aufgezeichnet. Nach insgesamt 5-minütiger Inkubation mit Substanz, wenn das neuronale Netzwerk einen stabilen Zustand errreicht hatte, wurde die neuronale Netzwerkaktivität erneut eine Minute lang gemessen. Zwischen den einzelnen Substanzapplikationen wurde der Chip jeweils fünf Minuten lang mit Badlösung inkubiert und die Netzwerkaktivität als neue Eichung des Messsystems am Ende aufgezeichnet. Nach dem Auswaschen der Substanz war die als Ausgangswert gemessene Spike-Aktivität wiederhergestellt. So war es möglich, die Wirkung von L-Methionin, D,L-Homocystein, L-Homocysteinsäure und L-Homocysteinsulphinsäure in verschiedenen Konzentrationen auf die Spike- und Burst-Rate im Netzwerk zu bestimmen. Als Kontrolle für echte Spike-Aktivität erfolgte die letzte Messung mit dem Natriumkanalblocker TTX. Vorangegangene Messungen haben gezeigt, dass 20 nmol/l TTX ausreichend sind, um alle Aktionspotentiale zu blockieren.

Die Testlösungen wurden in allen geplanten Konzentrationen schon vor Beginn des eigentlichen Experiments hergestellt und jeweils am selben Tag frisch angesetzt. Sowohl die Applikation der Lösungen als auch der Lösungswechsel erfolgten manuell mit Handpipetten (Gilson, Frankreich).

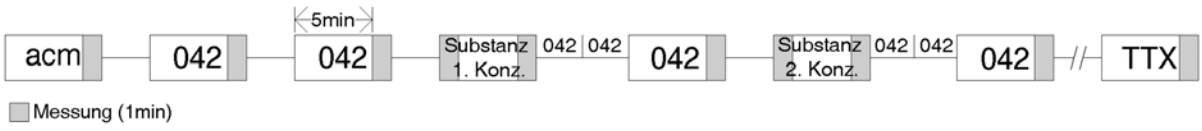

Abb. 7: Messprotokoll, acm = Astrozytenkonditioniertes Medium, 042 = Standardmesslösung; Konz. = Konzentration, letzte Messung mit Tetrodotoxin (TTX)

2.5 *MEA-Datenakquisition*

Zur Speicherung und Auswertung der Daten wurde ein Personalcomputer mit einem Athlon 1700 Prozessor und 280 GB Festplattenkapazität verwendet. Die Rohdaten von allen 60 Kanälen (Elektroden) wurden mit einer Samplingfrequenz von 25 kHz aufgezeichnet, über einen A/D-Wandler digitalisiert (12 bit) und mit Hilfe der Standardsoftware MCRack von Multi Channel Systems (Reutlingen) gespeichert. Das von den Elektroden abgeleitete Signal war während der Messung über eine spezielle Maske im 1-Sekundentakt zu verfolgen (Abb. 8). Elektroden, die ein gestörtes Signal lieferten, konnten zu Beginn des Experimentes durch das Umlegen von Mikroschaltern am Verstärker ausgeschaltet werden.

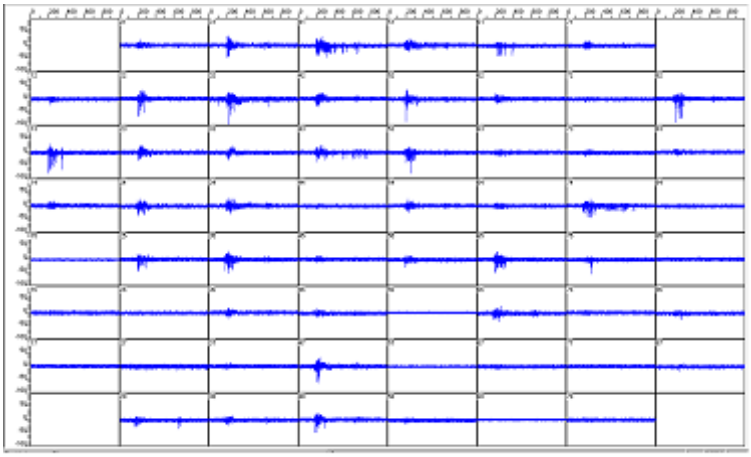

Abb. 8: Signale von 60 Elektroden, ablesbar im 1-Sekundentakt. Jedes Fenster zeigt das Signal einer Elektrode über einen Zeitraum von einer Sekunde. Die meisten Kanäle zeigen Burst-Aktivität.

Die Spike-Erkennung erfolgte offline durch das Programm Spanner 1.0 (RESULT, Deutschland). Um niederfrequente Artefakte zu unterdrücken, wurden die Daten vor der Analyse mit einem linearphasigen Hochpass-FIR-Filter mit 15 dB Dämpfung unterhalb der Stopbandfrequenz von 100 Hz gefiltert.

2.6 *Datenauswertung und -darstellung*

Ausgewertet wurden Messungen, die nach 5-minütiger Einwirkungszeit der Testsubstanzen erfolgten. Aus früheren Messreihen ist bekannt, dass der Lösungswechsel aufgrund hydromechanischer Reizung zu einer gewissen Aktivierung der neuronalen Netzwerkaktivität führt. Um keinen ungewöhnlichen Soforteffekt, der eventuell nur kurz anhält, zu verpassen, wurden dennoch Messungen in der ersten Minute nach Lösungswechsel durchgeführt .
Die ermittelten Daten werden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben, n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Messungen. Die Änderung der Spike-Rate wurde aus

dem Quotienten der spontanen Spike-Rate nach Substanzapplikation und der spontanen Spike-Rate, die als Ausgangswert kurze Zeit vor der Substanzapplikation unter Standardbadlösung bestimmt wurde, berechnet. Die Substanzeffekte wurden mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test auf Signifikanz geprüft, wobei $p < 0,05$ als signifikant betrachtet wurde. Unter Verwendung der Hill-Gleichung (Abb. 9) wurden sigmoidale Dosis-Wirkungskurven durch nicht lineare Regression der kleinsten Quadrate erstellt (ORIGIN Software, Microcal Software, Northampton, MA, USA)

Die Hill-Formel wurde zum Anpassen der Kurven für das Verhältnis von Konzentration zu Hemmung verwendet. h ist der Hill-Koeffizient, c die Konzentration, IC_{50} die halbmaximale Hemmkonzentration und f_i die relative Inhibition:

$$f_i(c) = \frac{1}{1 + \left[\frac{IC_{50}}{c}\right]^h}$$

Abb. 9: Hill-Gleichung

2.7 *Material*

2.7.1 Allgemeine Chemikalien

Von Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein): HAM's F-12, Laminin, Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium (DMEM), fötales Kälberserum (FCS), Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS). Von Sigma-Aldrich (Deisenhofen): Poly-D-Lysin (PDL), Insulin, Glutamin, Progesteron, Natriumselenit, Transferrin, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, HEPES, Glukose, L-Methionin, D,L-Homocystein, L-Homocysteinsäure, L-Homocysteinsulphinsäure. Von Boehringer (Mannheim): Trypsin, EDTA. Von Alomone (Jerusalem, Israel): Tetrodotoxin (TTX).

2.7.2 Kultur- und Nährmedium

Das Langzeitüberleben der Neurone wurde durch Verwendung von konditioniertem Kulturmedium ermöglicht. Astrogliakulturen gaben neurotrophe Faktoren in das folgende serumfreie Kulturmedium ab (Schmalenbach und Müller, 1993).

N2-Medium: 75% DMEM, 25% HAM's F-12, 5 µg/ml Insulin, 100 µg/ml Transferrin, 2 mmol/l Glutamin, 30 nmol/l Natriumselenit, 100 µmol/l Putreszin, 20 nmol/l Progesteron.

Adhäsionsmoleküle von Astrozyten stimulieren das Auswachsen von Neuriten (Matthiessen et al., 1989).

2.7.3 Lösung für die elektrophysiologischen Messungen

Standardbadlösung (042): 150 mmol/l NaCl, 4 mmol/l KCl, 28 mmol/l $CaCl_2$, 10 mmol/l HEPES, 10 mmol/l Glukose, pH 7,4 mit NaOH eingestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 *Änderung der spontanen Spike-Rate neuronaler Netzwerke durch L-Methionin, D,L-Homocystein, L-Homocysteinsäure (L-HCA) und L-Homocysteinsulphinsäure (L-HCSA)*

Es wurde untersucht, ob D,L-Homocystein, L-Methionin, L-HCA und L-HCSA die spontane Spike-Rate eines primär dissoziierten neuronalen Netzwerkes in vitro beeinflussen. Dazu wurden Dosis-Wirkungskurven der Änderung der spontanen Spike-Rate nach Inkubation mit den jeweiligen Substanzlösungen im Vergleich zur vorhergehenden Kontrollmessung bestimmt.

3.1.1 Reduktion der spontanen Spike-Rate durch L-Methionin

Die Effekte von L-Methionin wurden im Konzentrationsbereich von 10 µmol/l bis 5 mmol/l (n = 16) untersucht.
Unter L-Methionin im Konzentrationsbereich von 10 bis 100 µmol/l war kein signifikanter Unterschied in der spontanen Spike-Rate im Vergleich zur Kontrolle festzustellen (106% ± 25%, n = 3). Die Abnahme der spontanen Spike-Rate, die durch 200 bis 500 µmol/l L-Methionin ausgelöst wurde, betrug 53% (± 30%, n = 4). Bei Applikation von 1 bis 5 mmol/l L-Methionin (n = 9) sank die spontane Spike-Rate auf 9% (± 19%) des Ausgangswertes ab.

Die Anpassung der Dosis-Wirkungskurve an die Hill-Gleichung zeigte eine IC_{50} von 412 µmol/l (Hill-Koeffizient: –1,44) und einen Konzentrationsbereich von zwei Zehnerpotenzen, in dem die spontane Spike-Rate abnahm (Abb. 10). Die beobachteten Effekte von L-Methionin waren nach Auswaschen reversibel.

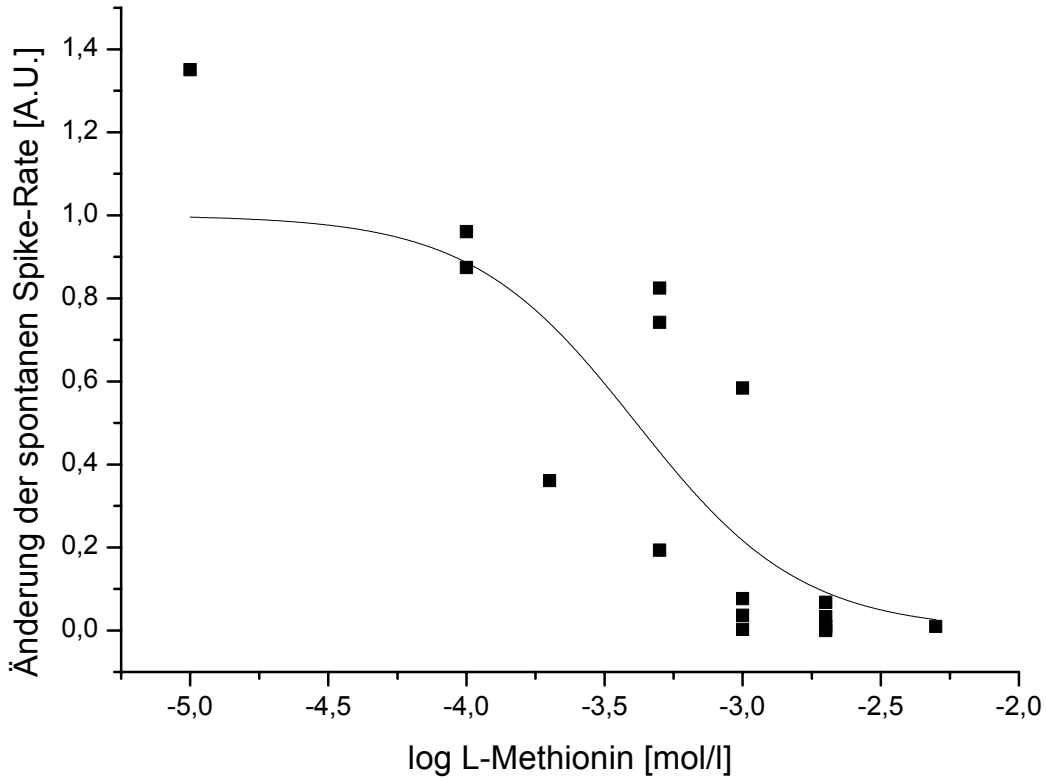

Abb. 10: Dosis-Wirkungskurve von L-Methionin, X-Achse: Konzentration von L-Methionin in mol/l, logarithmiert; Y-Achse: relative Änderung der spontanen Spike-Rate in Arbitrary Units; IC_{50} = 412 µmol/l.

3.1.2 Reduktion der spontanen Spike-Rate durch D,L-Homocystein

Die Mikroelektroden-Arrays mit den neuronalen Netzwerken wurden D,L-Homocystein im Konzentrationsbereich von 10 µmol/l bis 5 mmol/l ausgesetzt (n = 21). Die Änderung der spontanen Spike-Rate nach Substanzapplikation wurde bestimmt.

Bei keiner der untersuchten Kulturen war ein relevanter Einfluss von 10 - 200 µmol/l D,L-Homocystein (n = 4) auf die spontane Spike-Rate zu belegen (106% ± 13%). Bei Applikation von D,L-Homocystein in Konzentrationen zwischen 400 und 800 µmol/l (n = 14) kam es nach wenigen Sekunden zu einer Abnahme der spontanen Spike-Rate auf ein Fünftel der Kontrollwerte (20% ± 23%, $p < 0{,}001$). Konzentrationen oberhalb von 800 µmol/l (n = 3) reduzierten die Spike-Rate auf einzelne Spike-Ereignisse pro Minute oder führten zu einer kompletten Inhibition von Spikes. Nach Auswaschen von D,L-Homocystein stellte sich reversibel die Spike-Rate ein, die als Kontrollwert vor Substanzapplikation mit Standardbadlösung gemessen wurde.

Die Dosis-Wirkungskurve ergab eine IC_{50} von 401 µmol/l (± 28 µmol/l) mit einer starken Abnahme der spontanen Spike-Rate im Konzentrationsbereich von 200 bis 800 µmol/l (Abb. 11).

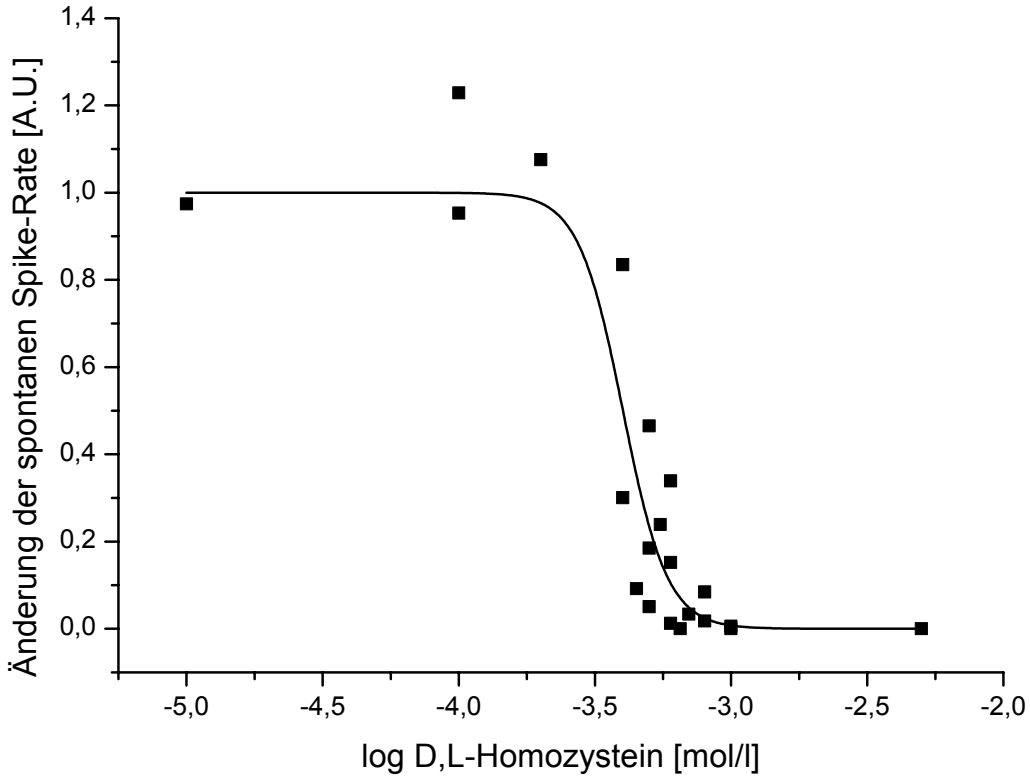

Abb. 11: Dosis-Wirkungskurve von D,L-Homocystein, X-Achse: Konzentration von D,L-Homocystein in mol/l, logarithmiert; Y-Achse: relative Änderung der spontanen Spike-Rate in Arbitrary Units; IC_{50} = 401 µmol/l.

3.1.3 Reduktion der spontanen Spike-Rate durch L-Homocysteinsäure (L-HCA)

Es wurde die spontane Spike-Rate unter dem Einfluss von L-HCA (10 nmol/l bis 50 µmol/l) bestimmt. Die Frequenzabnahme, die durch 1,3 µmol/l L-HCA ausgelöst wurde, betrug 50% ($IC_{50,}$ n = 20), wobei sich eine komplette Hemmung der spontanen Spike-Rate in Konzentrationen oberhalb von 10 µmol/l zeigte (n = 5) (Abb. 12).

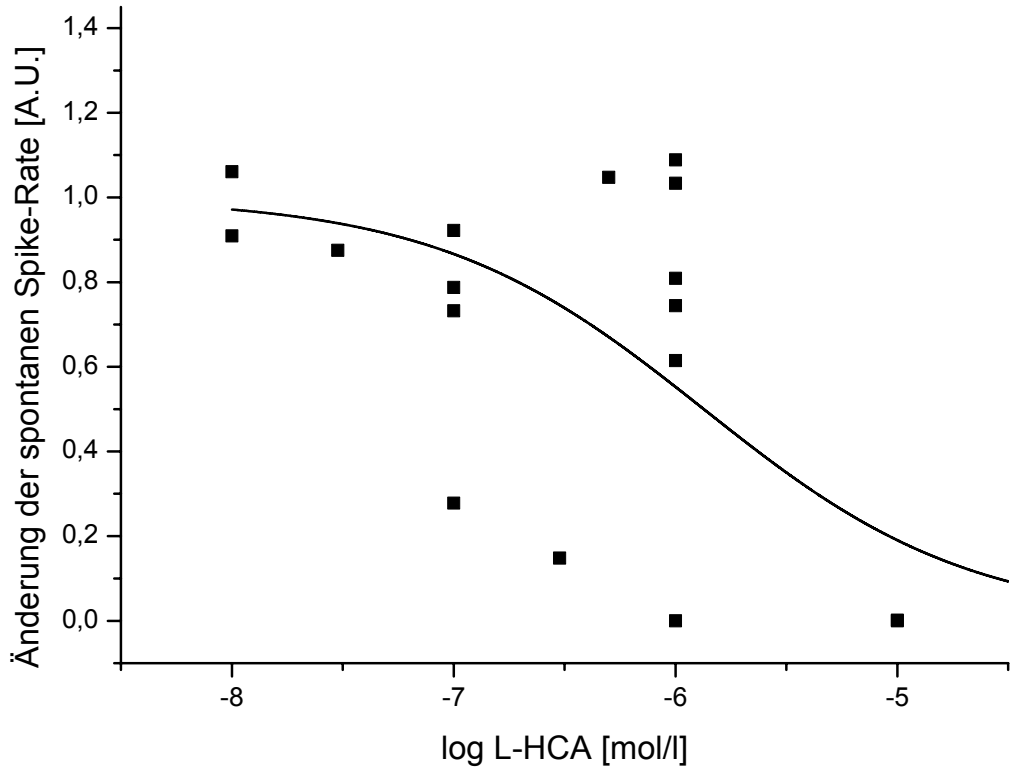

Abb. 12: Dosis-Wirkungskurve von L-Homocysteinsäure (L-HCA), X-Achse: Konzentration von L-HCA in mol/l, logarithmiert; Y-Achse: relative Änderung der spontanen Spike-Rate in Arbitrary Units; IC_{50}= 1,3 µmol/l.

3.1.4 Reduktion der spontanen Spike-Rate durch L-Homocysteinsulphinsäure (L-HCSA)

Es wurde die spontane Spike-Rate unter dem Einfluss von L-HCSA zwischen 10 nmol/l und 20 µmol/l bestimmt (n = 17). Die Applikation von mehr als 5 µmol/l L-HCSA führte zu einer kompletten Inhibierung der spontanen Spike-Rate (n = 5). Aus der zugehörigen Dosis-Wirkungskurve ließ sich eine IC_{50} von 1,9 µmol/l ableiten (Abb. 13).

Nach Auswaschen von L-HCSA stellte sich reversibel die Spike-Rate ein, die vor der Messung in reiner Badlösung bestimmt wurde.

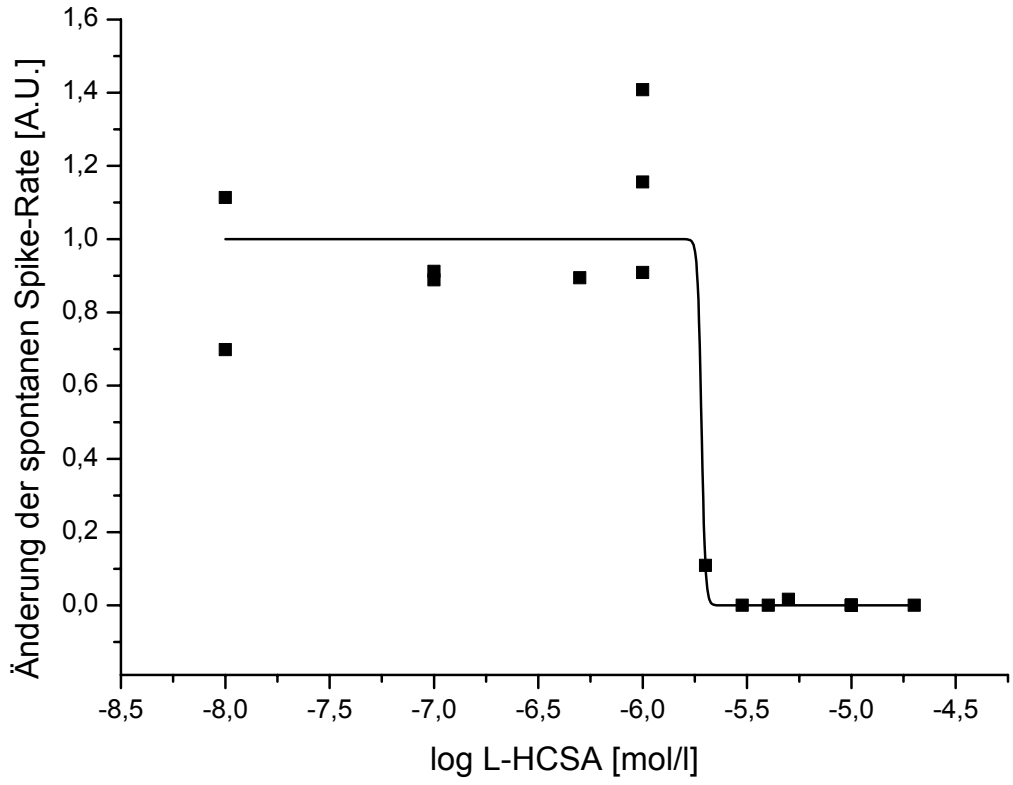

Abb. 13: Dosis-Wirkungskurve von L-Homocysteinsulphinsäure (L-HCSA), X-Achse: Konzentration von L-HCSA in mol/l, logarithmiert; Y-Achse: relative Änderung der spontanen Spike-Rate in Arbitrary Units; IC_{50}= 1,9 µmol/l.

3.1.5 Additive Reduktion der spontanen Spike-Rate durch die Metabolite in Kombination

Da die untersuchten Metabolite im Patienten nicht isoliert vorliegen und möglicherweise nicht unabhängig voneinander wirken, wurde der Effekt einer simultanen Einwirkung von L-Methionin, D,L-Homocystein, L-HCA und L-HCSA auf das neuronale Netzwerk untersucht. Dafür wurde ein „Cocktail“ gewählt, der alle Substanzen in ihren jeweiligen IC_{50}-Konzentrationen beinhaltete, gelöst in der in dieser Arbeit üblichen Badlösung.

Die spontane Spike-Rate sistierte nach Exposition des Netzwerkes gegenüber diesem Cocktail vollständig (n = 2). Nach Verdünnung der Mischung mit Standardbadlösung auf 50% der jeweiligen IC_{50} zeigte sich eine deutliche Abnahme der spontanen Spike-Rate (n = 3). Kein Effekt auf die spontane Spike-Rate war nach Applikation einer Mischung der vier Substanzen unterhalb einer 10-prozentigen Konzentration ihrer jeweiligen IC_{50} zu beobachten (n = 5).

3.2 *Änderung des Spike-Musters des neuronalen Netzwerkes durch L-Methionin, D,L-Homocystein, L-HCA und L-HCSA*

3.2.1 L-Methionin hat keinen Einfluss auf die Organisation von Spikes in Bursts

Die Analyse der Spike-Raster-Plots im fallenden Bereich der Dosis-Wirkungskurve offenbarte, dass selbst bei 4-fachen Konzentrationen der IC_{50} keine Änderung der Rate von in Bursts gruppierten Spikes vorlag. Auf N = 3 MEAs in M = 8 Messungen an n = 28 Kanälen fand sich keine Reduktion des hohen Anteils von Spikes in Bursts (typisch 87 ± 12% sowohl unter L-Methionin als auch im Kontrollexperiment).

3.2.2 D,L-Homocystein führt zu einer Inhibition von Bursts zugunsten von Einzel-Spikes

Unter 200 und 400 µmol/l D,L-Homocystein (IC_{50}) ließ sich keine Reduktion des Anteils von Spikes in Bursts feststellen (jeweils 85 ± 9% sowohl nach Substanzapplikation als auch im Kontrollexperiment, n = 9 Kanäle). Bei Konzentrationen knapp oberhalb der IC_{50} sank der Anteil aller Spikes, der Teil eines Bursts war, von 97% in den Kontrollmessungen (± 2%, n = 22 Kanäle; Abb. 14) auf 50 ± 25% bzw. 69 ± 23%, (n = 17 Kanäle; Abb. 15) unter D,L Homocystein (500 µmol/l) ab. Die 1,5-fache Homocysteindosis der IC_{50} führte bereits zu einem starken Einbruch der Gesamtaktivität, in der Restaktivität waren nur noch 3% der Spikes Teil eines Bursts (N = 2 MEAs, M = 3 Messungen, n = 10 Kanäle).

3.2.3 L-HCSA führt zu einer Inhibition von Bursts zugunsten von Einzel-Spikes

Für Konzentrationen von L-HCSA um die halbe IC_{50} kam es zu keiner signifikanten Änderung des Anteils von Spikes in Bursts (N = 3 MEAs, M = 5 Messungen, n = 30 Kanäle, Änderung des Anteils von Spikes in Bursts von 96 ± 4% auf 91 ± 4% M = 3, von 94 ± 6% auf 79 ± 14% und von 63 ± 33% auf 59 ± 23%). Die Konzentration 2 µmol/l L-HCSA (IC_{50}) führte zu einem starken Einbruch der danach ausschließlich aus Einzelspikes bestehenden Gesamtaktivität.

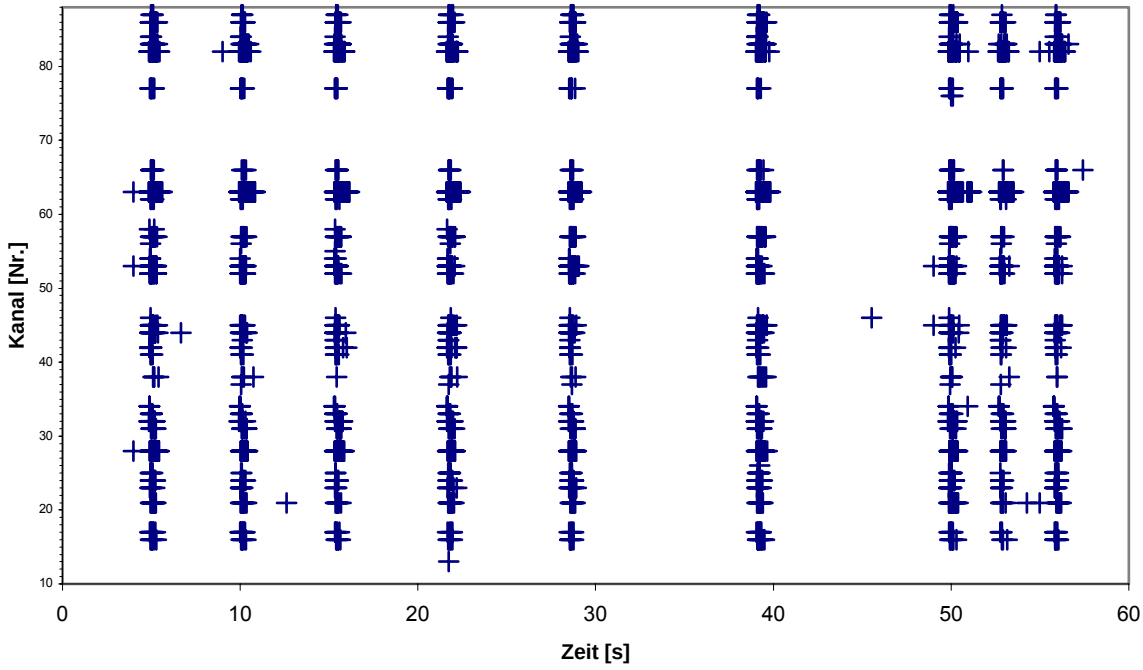

Abb. 14: Spike-Raster-Plot unter Standardbadlösung vor Applikation von D,L-Homocystein. Die + Zeichen symbolisieren das Auftreten eines spontanen Aktionspotentials. Die corticalen Kulturen zeigen synchrone, repetitive Burstmuster über das gesamte Netzwerk verteilt.

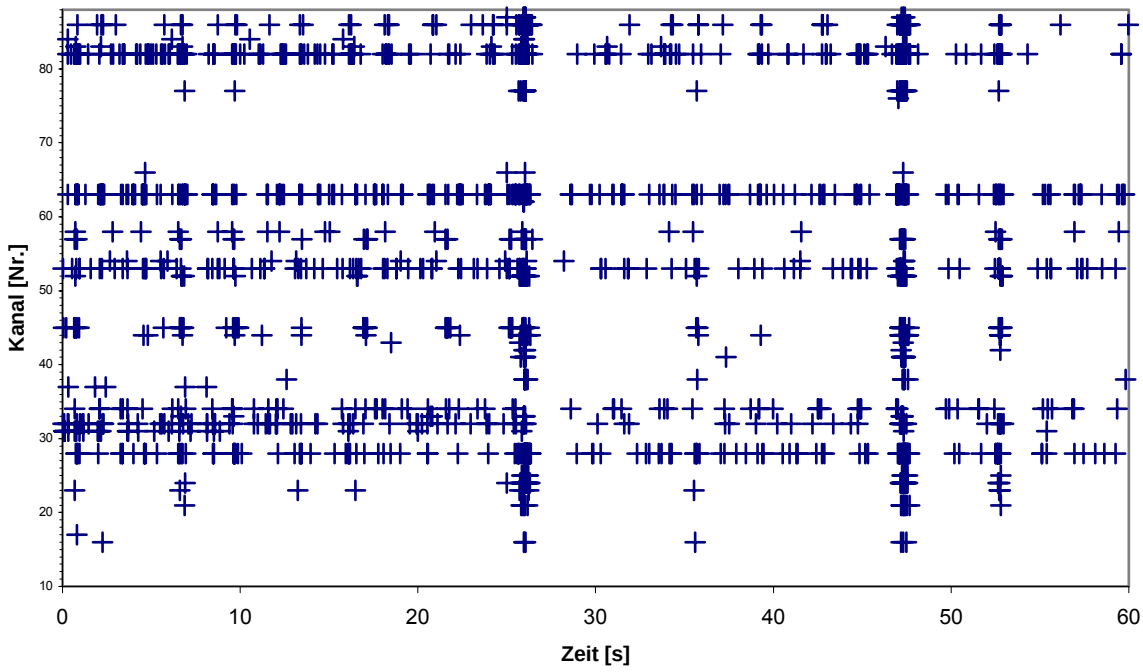

Abb. 15: Spike-Raster-Plot nach Applikation von 500 µmol/l D,L-Homocystein, dasselbe neuronale Netzwerk auf demselben MEA in einer Messreihe

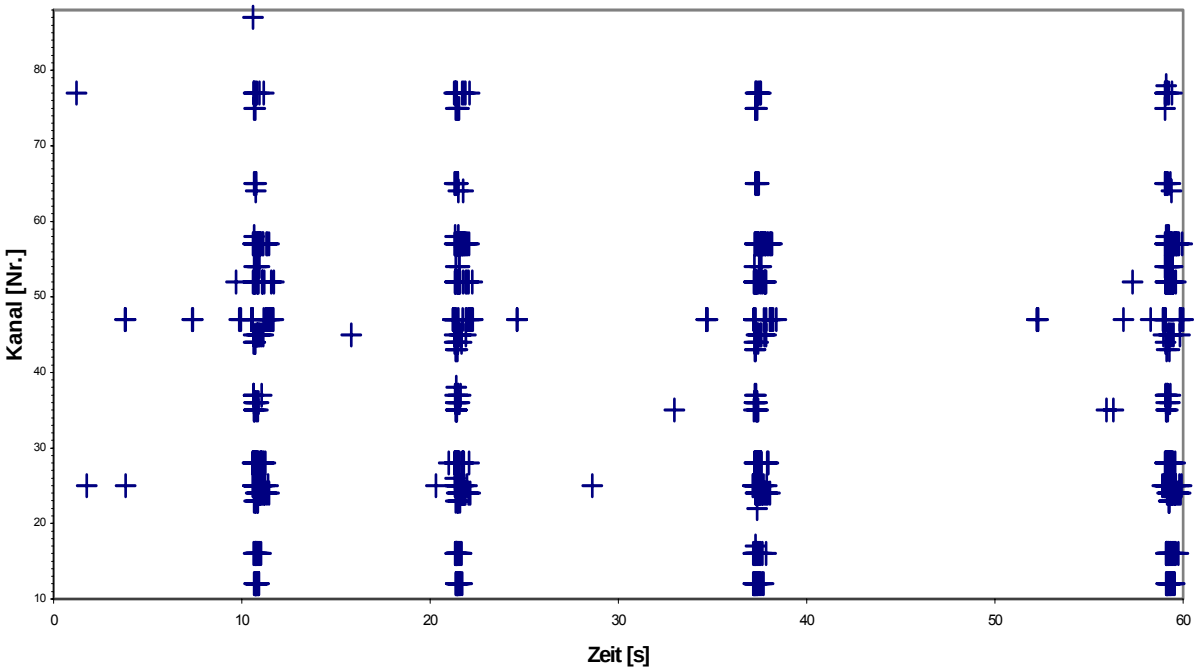

Abb. 16: Spike-Raster-Plot unter Standardbadlösung vor L-HCA-Applikation

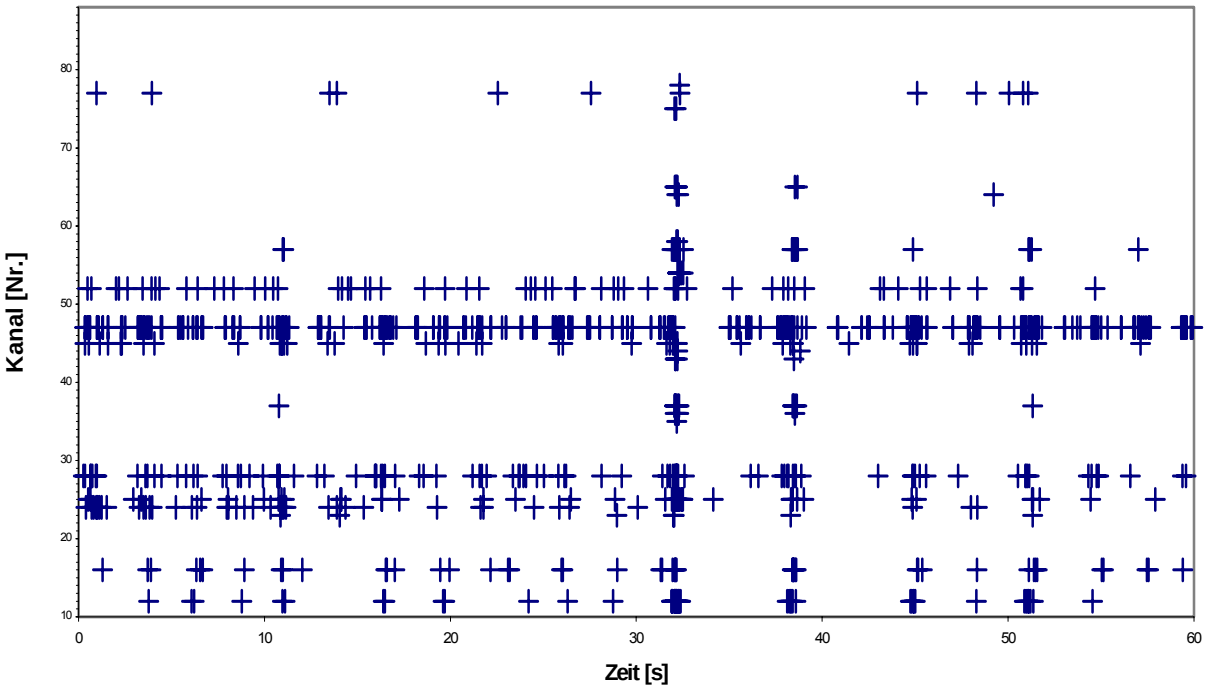

Abb. 17: Spike-Raster-Plot nach Applikation von 1µmol/l L-HCA, dasselbe neuronale Netzwerk auf demselben MEA in derselben Messreihe

3.2.4 L-HCA führt zu einer Inhibition von Bursts zugunsten von Einzel-Spikes

Für Konzentrationen zwischen $IC_{50}/2$ und IC_{50} findet sich in einem Teil der Messungen bereits eine deutliche Reduktion der Gesamtaktivität, begleitet von einer Reduktion der Anzahl von Spikes, die sich in einem Burst befinden (von 84 ± 13% auf 28%, 88 ± 8% auf 6%, 68 ± 20% auf 9%, 86 ± 10% auf 0% , N = 2 MEAs, n = 12 Kanäle). Bei einem weiteren MEA mit sehr hoher Grundaktivität des neuronalen Netzwerkes auf vielen Kanälen wird dieses Phänomen quantitativ maskiert, da das „Auflösen" der Burst-Struktur zunächst nur auf wenigen Kanälen erfolgte: Unter 1 µmol/l L-HCA kam es zu einer Reduktion des Anteils von Spikes in Bursts von 93 ± 7% in den Kontrollmessungen auf 74 ± 30%, 69 ± 18% bzw. 71 ± 21%, n = 34 Kanäle; unter 500 nmol/l L-HCA zeigte sich hier noch keine Musteränderung. Abb. 16 und Abb. 17 zeigen das Phänomen der beobachteten Musteränderung bei einer weiteren Messung sehr deutlich.

3.3 *Vergleich der spontanen Spike-Rate und der Musteränderung nach L-HCA- und L-HCSA-Applikation mit der Wirkung von NMDA*

Aus der Literatur ist bekannt, dass L-HCA und L-HCSA Agonisten an dem Glutamatrezeptorsubtyp NMDA-Rezeptor sind. Um zu prüfen, ob die Beobachtungen der reduzierten spontanen Spike-Rate sowie einer Musteränderung unter L-HCA und L-HCSA im MEA-Messsystem über diesen Rezeptor vermittelt werden, war der Vergleich mit einer dort wirkenden Substanz erforderlich. Es wurde das diesen Rezeptor benennende NMDA gewählt.

NMDA–Stammlösung wurde mit Standardbadlösung so verdünnt, dass Endkonzentrationen von 10 nmol/l bis 100 µmol/l resultierten (n = 28). Die spontane Spike-Aktivität war komplett blockiert, wenn die Konzentrationen 5 µmol/l überschritten.

Nach Anpassen einer Dosis-Wirkungskurve an die für NMDA ermittelten Daten ließ sich eine IC_{50} von 1,1 µmol/l ablesen (Abb. 18). Die Regression scheint die Daten im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 µmol/l jedoch nur mäßig zu repräsentieren. Allerdings liegen für die Anpassung einer triphasischen Dosis-Wirkungskurve nicht genügend Daten vor, da weitere 3 Parameter bestimmt werden müssten. Diese Abweichung könnte auf einen zusätzlichen exzitatorischen Effekt von NMDA in Konzentrationen hinweisen, die unterhalb der Hemmschwelle liegen.

Die durch NMDA induzierte Hemmung der spontanen Spike-Rate wurde begleitet von einem Verlust des synchronisierten Burst-Musters und gehäuftem Auftreten von unkorrelierten Einzel-Spikes (Abb. 19 u. Abb. 20).

Nach diesem indirekten Hinweis auf eine NMDA-analoge Wirkung wurde der positive Beweis geführt durch die Applikation des NMDA-Antagonisten APV.

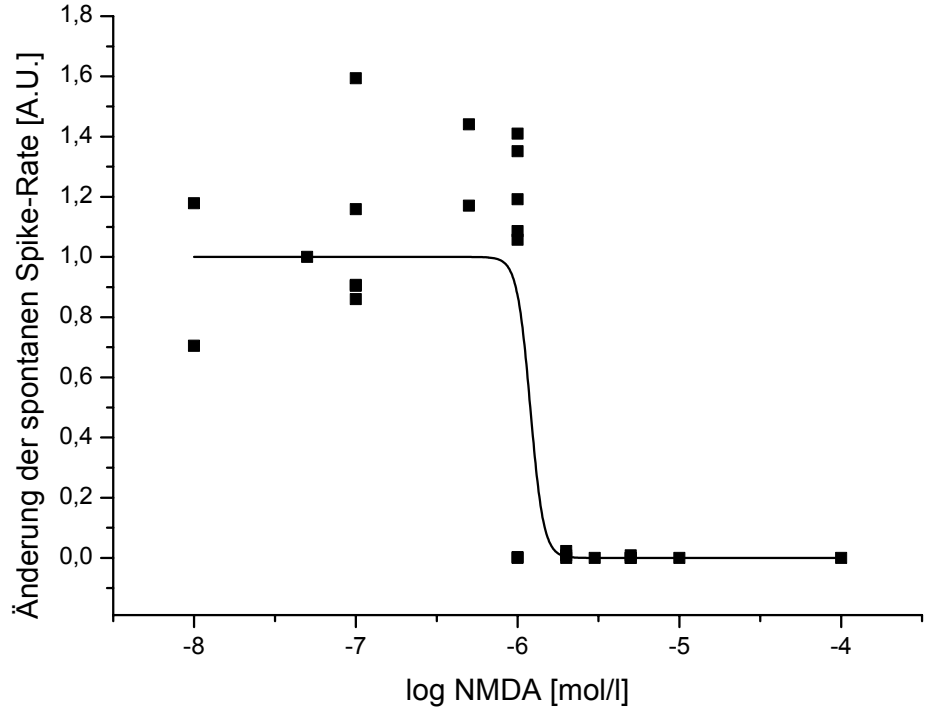

Abb. 18: N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), X-Achse: Konzentration von NMDA in mol/l, logarithmiert; Y-Achse: relative Änderung der spontanen Spike-Rate in Arbitrary Units; IC_{50} = 1,1 µmol/l

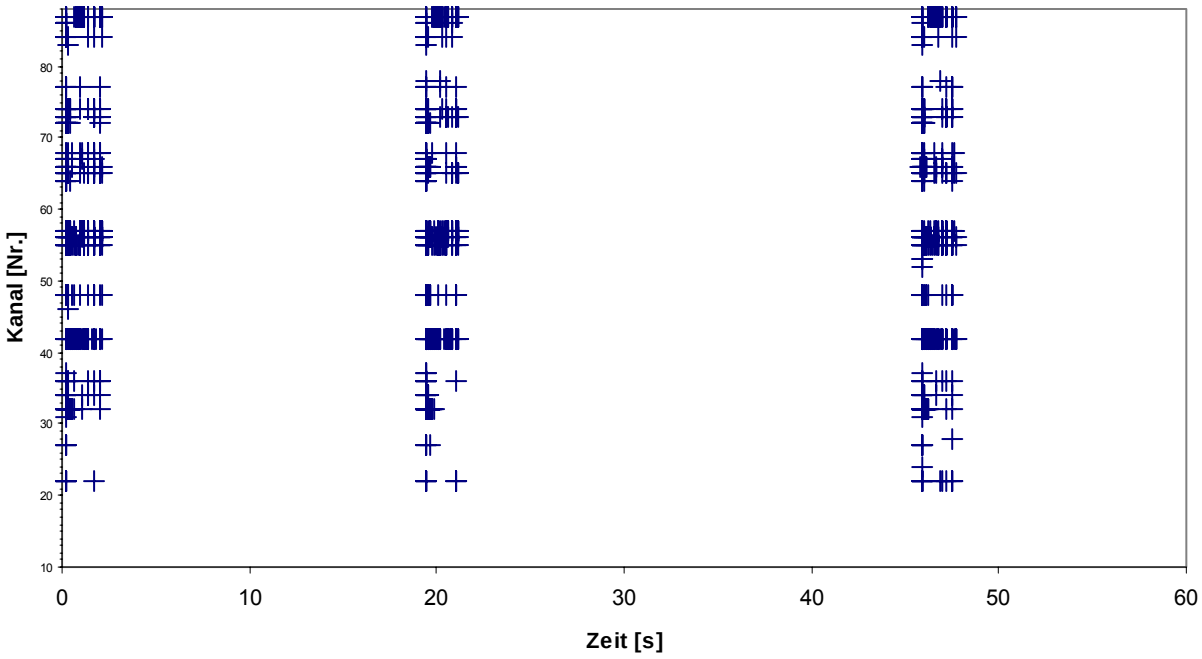

Abb. 19: Spike-Raster-Plot unter Standardbadlösung, vor NMDA-Applikation

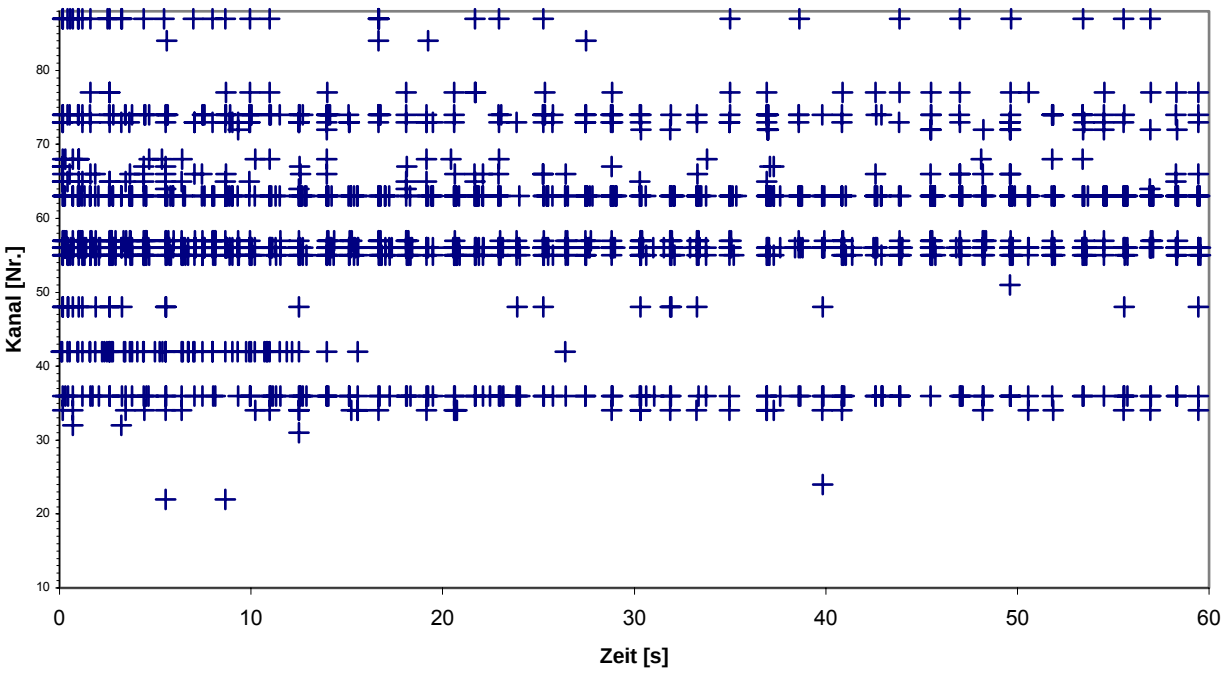

Abb. 20: Spike-Raster-Plot nach Applikation von 5 µmol/l NMDA, dasselbe neuronale Netzwerk auf demselben MEA in einer Messreihe

3.4 *Der NMDA-Antagonist 2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure (APV)*

3.4.1 Die Reduktion der SSR durch D,L-Homocystein ist antagonisierbar durch APV

Da D,L-Homocystein als Agonist am NMDA-Rezeptor beschrieben ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die kompetitive Wirkung des selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten APV untersucht. 500 µmol/l D,L-Homocystein reduzierte die spontane Spike-Rate (SSR) auf 26 ± 12% der Ausgangsaktivität, aber die zusätzliche Gabe von 20 µmol/l APV antagonisierte diese Hemmung signifikant (51 ± 11%; n = 3 Messungen; $p < 0,0001$) (Abb. 21).

3.4.2 Die Reduktion der SSR durch L-HCA und L-HCSA ist antagonisierbar durch APV

L-HCA in der Konzentration 500 nmol/l inhibierte die spontane Spike-Rate auf 22 ± 27% der Ausgangsaktivität, was mit Hilfe von 20 µmol/l APV signifikant zu 70 ± 9% (n = 3; $p = 0,07$) der Kontrollaktivität antagonisiert werden konnte. Analog hemmte 1 µmol/l L-HCSA die spontane Spike-Rate auf 23 ± 7%, wobei der Zusatz von APV (20 µmol/l) diese Hemmung auf 64 ± 10% des Kontrollniveaus kompensierte (n = 4; $p < 0,001$) (Abb. 21).

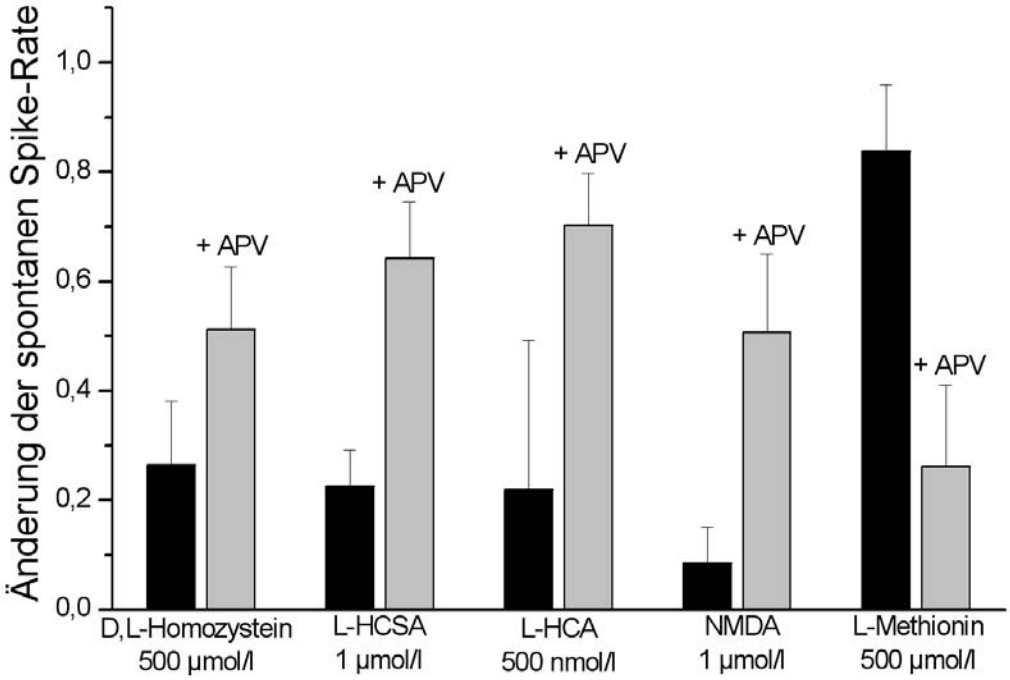

Abb. 21: Antagonisierung der Metabolitwirkungen mit Hilfe des NMDA-Antagonisten APV (20 µmol/l): links (schwarz) = spontane Spike-Rate nach Homocysteinmetabolit-Applikation; rechts (grau) = spontane Spike-Rate nach zusätzlicher Applikation von APV

3.4.3 Die Reduktion der spontanen Spike-Rate nach Zugabe von APV zu Methionin

Im Gegensatz zu den oben genannten Metaboliten lässt sich die Wirkung von L-Methionin nicht durch APV antagonisieren. Sie ist unabhängig vom NMDA-Rezeptor. Es kommt hier das inhibitorische Potential von APV zum Ausdruck. L-Methionin in der Konzentration 500 µmol/l inhibierte die spontane Spike-Rate auf 84 ± 12% der Ausgangsaktivität, und die zusätzliche Gabe von 20 µmol/l APV führte zu einer zusätzlichen Inhibition auf 26 ± 15% ($n = 6$; $p < 0{,}001$) (Abb. 21).

4 DISKUSSION

Aufgrund der Untersuchungen dieser Arbeit ergab sich als Hauptergebnis, dass die spontane neuronale Netzwerkaktivität in vitro durch die bei der Hyperhomocysteinämie erhöhten Metabolite konzentrationsabhängig und reversibel inhibiert wird. Es zeigte sich, dass L-Homocysteinsulphinsäure (L-HCSA) und L-Homocysteinsäure (L-HCA) in Konzentrationsbereichen wirkten, die tatsächlich in Patienten mit schwerer Hyperhomocysteinämie vorkommen, während D,L-Homocystein selbst und L-Methionin keine relevante Hemmung ausübten.

4.1 *L-HCSA und L-HCA als relevante Noxen*

Unter dem Einfluss sowohl von L-HCSA als auch von L-HCA war eine reversible Abnahme der spontanen Spike-Rate zu detektieren mit einer in beiden Fällen sehr niedrigen IC_{50} (L-HCSA: IC_{50} = 1,9 µmol/l; L-HCA: IC_{50} = 1,3 µmol/l). So reduzierten sie die spontane Spike-Rate 250-fach wirkungsvoller als DL-Homocystein (IC_{50} = 401 µmol/l).
Die Frequenzänderungen unter L-HCA lagen im Bereich der relevanten Konzentrationen von 1,5 µmol/l L-HCA bei Gesunden und bis zu 8,6 µmol/l L-HCA im Plasma von Homocystinuriepatienten (Lubec et al., 1996; Fritzer-Szekeres et al., 1998). Die in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen sind in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Folbergrova et al. (2000): Nach intrakranieller Applikation von 0,6 µmol/l L-HCA wurde neuronale Dysfunktion von lebendigen Ratten beschrieben, eine Konzentration, die auch in dem In-vitro-System dieser Arbeit die spontane Spike-Rate hemmte.
Die Normalwerte für L-HCSA im menschlichen Serum betragen 0,18 nmol/l (Santosh-Kumar et al., 1994). Für Patienten mit Hyperhomocysteinämie liegen keine Zahlen vor, nach allgemeiner Einschätzung liegen sie aber in einem ähnlichen Bereich, wie er für L-HCA genannt wurde.
Im Gegensatz dazu sind selbst die Homocysteinkonzentrationen, die bei Patienten mit schwerster Hyperhomocysteinämie vorkommen, deutlich niedriger als diejenigen, die einen Einfluss auf die spontane Spike-Rate im Messsystem dieser Arbeit hatten (IC_{50} = 401 µmol/l). Der Plasmahomocysteinspiegel liegt bei Gesunden bei ca. 10 µmol/l. Demenzpatienten zeigen Homocysteinspiegel zwischen 15 und 30 µmol/l, Patienten mit behandelter Homocystinurie haben typischerweise Homocysteinwerte von 50 bis 150 µmol/l, bei unbehandelter Homocystinurie zwischen 100 und 500 µmol/l.

4.2 *Die elektrophysiologische Beteiligung von D,L-Homocystein und L-Methionin an der neuronalen Dysfunktion der Hyperhomocysteinämie ist gering*

Streck et al. (2002) postulieren zur Pathogenese der Homocystinurie, dass der Na^+-K^+-ATPase im Gehirn eine bedeutende Rolle zukomme. Sie folgern, dass die verminderte Na^+-K^+-ATPase-Aktivität in synaptischen Plasmamembranen bei Hyperhomocysteinämie möglicherweise die Ursache der neurologischen Symptomatik sei.
Experimentell konnte in den elektrophysiologischen Messungen dieser Arbeit jedoch kein Effekt von D,L-Homocystein auf die spontane Spike-Rate in den für Homocystinuriepatienten relevanten Konzentrationen gezeigt werden (IC_{50} = 401 µmol/l). Man kann nicht ausschließen, dass eine verminderte Na^+-K^+-ATPase-Aktivität Einfluss auf die Langzeitfunktion von Neuronen hat.
Auch bleibt anzumerken, dass die hier anhand von neuronalen Netzwerken der embryonalen Ratte erhobenen hohen Homocysteinkonzentrationen, die die spontane Spike-Rate hemmten, nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind. Eine pathogenetische Beteiligung von Homocystein an den neurologischen Manifestationen der Homocystinurie kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Flott-Rahmel et al. (1998) folgern aus ihren Messungen, dass die Überstimulation von Glutamatrezeptoren (Exzitotoxizität) durch L-HCA und L-HCSA, aber nicht durch Homocystein, an der Entstehung der neurologischen Symptome der Homocystinurie beteiligt sein könnte. Sie schließen aber eine Beteiligung von Homocystein über andere nicht-glutamatrezeptorvermittelte Mechanismen an der neuronalen Schädigung der Homocystinurie nicht aus. Kritisch lässt sich anmerken, dass die von ihnen verwendete Homocysteinkonzentration, die neurotoxisch war, mit 5 mmol/l die in Patienten relevanten Konzentrationen weit überschritt.

4.3 *Wirkmechanismus von L-HCSA, L-HCA und D,L-Homocystein*

Die kurze Zeitkinetik, mit der L-HCSA, L-HCA und D,L-Homocystein auf die Aktivität eines neuronalen Netzwerkes wirkten, unterstützt die Hypothese eines rezeptorvermittelten Mechanismus (Otto et al., 2003). Die Reversibilität der Wirkung schließt eine Störung von Rezeptoren oder Ionenkanälen durch kovalente Effekte aus, da diese zu einer andauernden Frequenzabnahme führen müssten. Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass sich nach Applikation von L-HCSA, L-HCA und D,L-Homocystein die spontane Spike-Rate auf niedrigerem Niveau stabilisierte und keine weitere Abnahme zeigte.
Eine irreversible Schädigung eines zellulären Bestandteils oder das Ingangsetzen von Second-Messenger vermittelten zellulären Kaskaden über metabotrope Glutamatrezeptoren

hätte eine akkumulative Wirkung zur Folge und führte zu einer progredienten Abnahme der spontanen Spike-Rate. Dieses spricht dafür, dass der Aktivitätsänderung ein Mechanismus zu Grunde liegt, wie er für klassische Ionenkanalmodulatoren bekannt ist.
Folbergrova et al. (2000) wiesen unter L-HCA eine Zunahme der Krampfbereitschaft in vivo nach, die dosisabhängig auftrat. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der spontanen Spike-Rate entspricht diesen Ergebnissen. Antagonisiert werden konnte der Effekt mit NMDA-Antagonisten - wie in dieser Arbeit - und Non-NMDA-Antagonisten.
Im MEA-Messsystem führte eine Applikation der epileptogenen Substanz NMDA ebenfalls zu einer Inhibierung der neuronalen Netzwerkaktivität, welche durch NMDA-Antagonisten aufgehoben werden konnte. Ebenso ließ sich der inhibitorische Effekt von L-HCSA und L-HCA durch APV aufheben.
Der Vergleich der Änderung der Spike-Muster nach Applikation von L-HCA, L-HCSA bzw. NMDA ergab eine parallele Musteränderung. Dies sind Hinweise, dass der Effekt von L-HCA und L-HCSA über den NMDA-Rezeptor vermittelt wird.

4.4 *Die zentrale Rolle der exzitatorischen Aminosäuren L-Homocysteinsulphinsäure und L-Homocysteinsäure in der Pathogenese neurologischer Erkrankungen*

L-HCA und L-HCSA sind seit langem Gegenstand von Untersuchungen, da sie potentielle exzitatorische Aminosäureneurotransmitter wie Glutamat sind. Um ihre derartige Rolle zu stützen, wurde mit Erfolg versucht, sie in verschiedenen Geweben des zentralen Nervensystems nachzuweisen und ihre pharmakologischen Eigenschaften zu charakterisieren (Do et al., 1988; Cuenod et al.,1990; Tschopp et al., 1992).
In dieser Arbeit geht es um die krankheitsinduzierte Präsenz und Bedeutung von L-HCA und L-HCSA im zentralen Nervensystem bei der Homocystinurie und mit deutlicher Einschränkung auch bei der milden Hyperhomocysteinämie, die zwar mit den verschiedensten neurologischen Erkrankungen in Zusammenhang steht, für die jedoch L-HCA- und L-HCSA-Spiegel bisher nicht gemessen wurden.

Da L-HCA und L-HCSA potente Agonisten an allen bekannten Rezeptoren für exzitatorische Aminosäuren sind (Cuenod et al.,1986; Do et al., 1988; Kingston et al., 1998; Shi et al., 2003), könnte ihre Präsenz große Bedeutung für die Entstehung der Enzephalopathie der Homocystinurie sowie die Pathogenese von Demenzen haben.
Die Suche nach Enzymen, die ihre Biosynthese katalysieren, hat bis heute zu keinem Ergebnis geführt. Man fand lediglich ein Enzym, das Cystein zu Cysteinsulphinsäure oxidiert, und ein analoger Syntheseweg für L-HCSA und L-HCA wurde vorgeschlagen. Der Vorläufer von L-HCSA wäre Homocystein, und man nimmt an, die Oxidationen zu L-HCSA und weiter zu L-HCA liefen spontan ab. Dies könnte erklären, warum die L-HCA-Spiegel in Patienten

nicht streng mit dem Homocysteinspiegel korrelieren (Lubec et al., 1996). Verschiedene Oxidationszustände können die Reaktion von einer Substanz zu einer anderen entweder hemmen oder fördern.

Die Unfähigkeit, einen enzymkatalysierten Weg für die Synthese von L-HCSA und L-HCA bei der Homocystinurie zu identifizieren, stellt eine wichtige Hürde in der Akzeptanz ihrer Bedeutung für die Pathogenese der Erkrankung dar, die es in weiteren Untersuchungen zu nehmen gilt. Zum einen ergibt sich aus den Resultaten der Arbeit die Notwendigkeit, L-HCA und L-HCSA häufiger bei Patienten mit kognitiven Störungen zu messen, zum anderen stärken die Ergebnisse die Motivation in zukünftigen Untersuchungen, nach Enzymen zu forschen.

Hinsichtlich der Messungen in dieser Arbeit mit D,L-Homocystein kann die spontane Oxidation von D,L-Homocystein zu L-HCSA und L-HCA nicht ausgeschlossen werden. In diesem Falle resultierte die Hemmung der Netzwerkaktivität, die D,L-Homocystein zugeschrieben wurde, eigentlich von seinen oxidierten Metaboliten. In den Experimenten wurde das Razemat von Homocystein verwendet, so dass unklar bleibt, ob nur die natürliche L-Form die Hemmung der Netzwerkaktivität vermittelt, oder ob beide Stereoisomere gleichermaßen zu dem inhibitorischen Potential beitragen.

4.5 *Die Vitalität von Neuronen bleibt unter dem Einfluss der schwefelhaltigen Aminosäuren erhalten*

Sowohl D,L-Homocystein als auch seine oxidierten Metabolite sind bekannte Neurotoxine. Lipton et al. (1997) beobachteten Zelltod nach Homocysteinapplikation bei Langzeitmessungen, der auch mit der Pathogenese der Homocystinurie und milden Hyperhomocysteinämie in Verbindung gebracht wurde. Lipton et al. (1997) konnten in ihren Inkubationen die Oxidation zu HCA, HCSA und anderen potentiellen Neurotoxinen durch HPLC-Untersuchung des Inkubationsmediums ausschließen und den Zelltod durch verschiedene NMDA-Rezeptorantagonisten sowie durch Präinkubation mit Superoxiddismutase verhindern.

Im Gegensatz dazu propagieren Flott-Rahmel et al. (1998) die neurotoxische Wirkung von L-HCA und L-HCSA, die sie bereits nach Kurzzeitinkubationen feststellten und die sich durch NMDA- und Non-NMDA-Rezeptorantagonisten verhindern ließ, wohingegen DL-Homocystein erst in der Langzeitinkubation toxisch und nicht zu antagonisieren war. Methionin erwies sich selbst in der höchsten Konzentration von 5 mmol im Langzeitversuch als nicht toxisch.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind mit denen von Flott-Rahmel et al. (1998) insofern vereinbar, als dass L-HCA und L-HCSA in viel niedrigeren Konzentrationen wirkten als DL-Homocystein und keine der Substanzen im Kurzzeitversuch in den hier verwendeten

Konzentrationen toxisch war. Allerdings konnte in den hier präsentierten Experimenten die elektrophysiologische Wirkung von D,L-Homocystein mittels des NMDA-Antagonisten APV rückgängig gemacht werden, während Flott-Rahmel et al. (1998) keinen Einfluss von DL-Homocystein auf Glutamatrezeptoren fanden. Gegen das Modell der Exzitotoxizität mit dem Resultat Nervenzelluntergang spricht, dass diätetische Maßnahmen die kognitive Leistungsfähigkeit von Patienten verbessern können, und dass MRT-Bilder keine Auffälligkeiten zeigen, trotz schwerer mentaler Retardierung der Patienten.

4.6 *Der Mikroelektroden-Array – ein gutes Instrument zur Detektion funktioneller Stoffwechselstörungen*

Spontan aktive Netzwerke in Kultur auf Mikroelektroden-Arrays haben sich in vielen Laboren als sensitive und effiziente Modellsysteme zur Erforschung von Substanzwirkungen erwiesen. Stoffe mit bekannten Effekten auf Ionenkanäle sowie auf die synaptische Übertragung wirken dosisabhängig auf ein neuronales Netzwerk (Otto et al., 2005; Torborg et al., 2004). Gross et al. (1995) zeigten bereits die Sensitivität spinaler neuronaler Netzwerke für exzitatorische Aminosäuren wie Glutamat und Aspartat, für NMDA und Noradrenalin sowie für inhibitorische Neurotransmitter wie Glycin und GABA.

In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich neuronale Netzwerke auf Mikroelektroden-Arrays erstmals als sensitive Biosensoren, um Stoffwechselmetabolite zu detektieren. Die neuroaktiven Substanzen L-HCA und L-HCSA waren in so niedrigen Konzentrationen wie 1 µmol/l wirksam. Zwei neue Defekte im Pentosephosphatweg, verbunden mit auffälligen Polyolprofilen, führen wie die Homocystinurie zu neurologischen Auffälligkeiten. D-Arabitol und Ribitol in aufsteigenden Konzentrationen bis 10 mmol/l hatten im Gegensatz zu den Testsubstanzen dieser Arbeit keinen akuten Effekt auf die neuronale Netzwerkaktivität. Daraus lässt sich ableiten, dass Polyole nicht akut auf neuronale Aktivität wirken, sondern ein anderer Pathomechanismus für die klinische Symptomatik verantwortlich ist (Klusmann et al., 2005, im Druck). In dem Labor dieser Arbeit wird zurzeit eine weitere Stoffwechselerkrankung, die zu mentaler Beeinträchtigung führt, auf potentielle funktionelle Metabolitwirkungen auf den Neurochip gescreent. Weitere Arbeiten aus dem Stoffwechselbereich sollten folgen, da die Pathogenese dieser angeborenen Störungen mit meist neurologischer Manifestation nicht abschließend geklärt ist und mit dem Neurochip eine neue, wertvolle Methode zur Verfügung steht.

Der Neurochip ist im Gegensatz zu herkömmlichen elektrophysiologischen Methoden nicht nur für Untersuchungen zur Kurzzeit-, sondern auch zur Langzeittoxizität geeignet. Toxin-induzierte Änderungen in der spontanen Aktivität kultivierter neuronaler Netzwerke sind reproduzierbar, quantifizierbar und in allgemeiner Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten aus In-vivo-Experimenten (Gross et al., 1997; Gramowski et al., 2000; Keefer et al.,

2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Kurzzeittoxizität von D,L-Homocystein, L-HCA, L-HCSA und Methionin untersucht und in keinem Fall ein Einfluss auf das Überleben festgestellt, da die elektrische Aktivität jeweils nach Auswaschen der Substanz wiederherstellbar war. Ein weiterer Vorteil der Methode besteht darin, dass sie die Überwachung neuronaler Aktivität erlaubt, ohne die Integrität der Zellen zu verletzen. Langzeitinkubationen mit Substanzen über mehrere Tage sind bisher nicht erfolgt, könnten aber Gegenstand zukünftiger Untersuchungen mit Hilfe von Mikroelektroden-Arrays sein.

Darüber hinaus lassen sich Mikroelektroden-Arrays besonders gut für elektrophysiologische Messungen im Hinblick auf pharmakologische Applikationen anwenden. Zahlreiche zugelassene, alltäglich eingesetzte Wirkstoffe mit Wirkungen und Nebenwirkungen am zentralen Nervensystem wie Lidocain, Valproat und Chloroquin wurden bereits in diesem System gestestet (Chiappalone et al., 2003; O´Shaughnessy et al., 2003; Stüwe et al., 2004; Otto et al., 2005).

Einschränkend bleibt zu erwähnen, dass mit Hilfe von Mikroelektroden-Arrays zwar vielfältige Substanzwirkungen auf ein neuronales Netzwerk messbar sind, jedoch der zelluläre oder synaptische Wirkmechanismus nicht offensichtlich ist. Die Ergebnisse, die man aus Neurochip-Messungen erhält, sind beschränkt auf globale elektrophysiologische Parameter wie die Spike-Aktivität mit hoher Sensitivität bei geringer Spezifität. Um die Übersetzung bestimmter biochemischer Mechanismen in spezifische Aktivitätsmuster zu verstehen, ist es wichtig, die Aktivitätsmuster neuronaler Netzwerke zu analysieren, die durch Substanzen mit allgemein bekannten biochemischen Wirkungen hervorgerufen werden (Gramowski et al., 2004). Hier wurde das Aktivitätsmuster nach Applikation von NMDA mit dem erhaltenen Muster unter Einwirkung der Testsubstanzen verglichen und für L-HCA und L-HCSA und D,L-Homocystein eine analoge Wirkung festgestellt. Eine weitere Möglichkeit stellt die Anwendung von Antagonisten dar, welche das ursprüngliche Aktivitätsmuster vor Substanzapplikation wiederherstellen können, auf diese Weise aber auch nur einen indirekten Beweis des Wirkmechanismus erbringen. Dies geschah in der vorliegenden Arbeit nach Zugabe des NMDA-Antagonisten APV zu den jeweiligen Testsubstanzen Methionin, D,L-Homocystein, L-HCA und L-HCSA auf den Neurochip.

Straub et al. (2001) entwickelten einen Prototyp-Neurochip, der durch direkte ionoelektronische Kopplung von rekombinanten Kalium-Kanälen in HEK-Zellen mit einem Transistor die Messung von Ionenströmen ermöglicht. Allerdings ist diese Technik noch nicht mit primären Neuronen anwendbar. Zusätzliche elektrophysiologische Methoden, z.B. die Patch-Clamp-Technik, werden daher bis auf weiteres für eine präzisere Analyse neuronaler Aktivität benötigt.

Einige Autoren versuchen die bei lebenden Zellen vorhandene Variabilität der elektrischen Aktivität zu minimieren, indem sie das sich entwickelnde neuronale Netzwerk in festgelegte Bahnen lenken (Chang et al., 2001; Morin et al., 2005). Obwohl sich die dissoziierten neuronalen Kulturen der vorliegenden Arbeit frei entwickelten, zeigten alle Kulturen ab einer bestimmten Zelldichte regelmäßige synchrone Burst-Aktivität, die reversibel durch Substanzzugabe moduliert werden konnte.

4.7 *Ausblick*

Untersuchungen an derartigen Neurochips liefern einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der systemischen Wirkung von Substanzen an neuronalen Netzwerken und stellen damit das Bindeglied zwischen molekularen Mechanismen und Systemphysiologie dar. Neurochips könnten routinemäßig im klinischen Alltag als diagnostisches Mittel für Patienten mit neurologischen Krankheitsbildern sowie in der Pharmaindustrie zur Testung von Wirkungen und Nebenwirkungen von neuen Medikamenten eingesetzt werden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

American Academy of Pediatrics, Committee on Genetics (1996): Newborn screening fact sheets. Pediatrics 98(3 Pt 1): 473-501

Bayer SA, Altman J (1990): Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. Exp Neurol 107(1): 48-62

Cammann K (1992): Continuous pollution control by chemical sensors. Sens Actuators B Chem 6(1-3): 19-24

Carson NAJ, Neill DW (1962): Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. Arch Dis Child 37: 505-513

Chang JC, Brewer GJ, Wheeler BC (2001): Modulation of neuronal network activity by patterning. Biosens Bioelectron 16(7-8): 527-533

Chiappalone M, Vato A, Tedesco MB, Marcoli M, Davide F, Martinoia S (2003): Networks of neurons coupled to microelectrode arrays: a neuronal sensory system for pharmacological applications. Biosens Bioelectron 18(5-6): 627-634

Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM (1998): Folate, vitamin B_{12}, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer Disease. Arch Neurol 55: 1449-1455

Cuenod M, Audinat E, Do KQ, Gahwiler BH, Grandes P, Herrling P, Knopfel T, Perschak H, Streit P, Vollenweider F, et al. (1990): Homocysteic acid as transmitter candidate in the mammalian brain and excitatory amino acids in epilepsy. Adv Exp Med Biol. 268: 57-63

Cuenod M, Do KQ, Herrling PL, Turski WA, Matute C, Streit P (1986): Homocysteic acid, an endogeneous agonist of NMDA-receptor: release, neuroactivity and localization. Adv Exp Med Biol 203: 253-262

Dichter MA (1978): Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. Brain Res 149(2): 279-293

Do KQ, Herrling PL, Streit P, Cuenod M (1988): Release of neuroactive substances: homocysteic acid as an endogenous agonist of the NMDA receptor. J Neural Transm 72(3): 185-190

Egert U, Schlosshauer B, Fennrich S, Nisch W, Fejtl M, Knott T, Müller T, Hämmerle H (1998): A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. Brain Res Protoc 2 (4): 229-242

Folbergrova J (1997): Anticonvulsant action of both NMDA and non-NMDA receptor antagonists against seizures induced by homocysteine in immature rats. Exp Neurol 145(2 Pt 1): 442-450

Folbergrova J, Haugvicova R, Mares P (2000): Behavioral and metabolic changes in immature rats during seizures induced by homocysteic acid: The protective effect of NMDA and non-NMDA receptor antagonists. Exp Neurol 161 (1): 336-345

Flott-Rahmel B, Schürmann M, Fingerhut R, Mußhoff U, Fowler B, Ullrich K (1998): Homocysteic and homocysteine sulfinic acid exhibit excitotoxicity in organotypic cultures from rat brain. Eur J Pediatr 157 (2):112-117

Fritzer-Szekeres M, Blom HJ, Boers GH, Szekeres T, Lubec B (1998): Growth for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 10(1): 111-113

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP and Rozen R (1995): A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 10(1): 111-113

Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA (1962): The identification of homocystine in the urine. Biochem Biophys Res Commun 9: 493-496

Gramowski A, Jugelt K, Weiss DG, Gross GW (2004): Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. Eur J Neurosci 19(10): 2815-2825

Gramowski A, Schiffmann D, Gross GW (2000): Quantification of acute neurotoxic effects of trimethyltin using neuronal networks cultured on microelectrode arrays. Neurotoxicology 21(3): 331-342

Griffith OW (1987): Mammalian sulfur amino acid metabolism: An overview. Methods Enzymol. 143: 366-376

Gross GW, Norton S, Gopal K, Schiffmann D, Gramowski A (1997): Neuronal networks in vitro: Applications to neurotoxicology, drug development, and biosensors. Cell Eng 2(4):138-147

Gross GW, Rhoades BK (1995): The use of neuronal networks on multielectrode arrays as Biosensors. Biosens.Bioelectron. 10(6-7): 553-567

Herrling PL, Maeder J, Meier CL, Do KQ (1989): Differential effects of (D)- and (L)-homocysteic acid on the membrane potential of cat caudate neurons in situ. Neuroscience 31(1): 213-217

Jimbo Y, Kawana A, Parodi P, Torre V (2000): The dynamics of a neuronal culture of dissociated cortical neurons of neonatal rats. Biol Cybern 83: 1-20

Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G (1988): Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. Am J Hum Genet 43(4): 114-421

Keefer EW, Gramowski A, Stenger DA, Pancrazio JJ, Gross GW (2001): Characterization of acute neurotoxic effects of trimethylolpropane phosphate via neuronal network biosensors. Biosens Bioelectron 16: 513-525

Kingston AE, Lowndes J, Evans N, Clark B, Tomlinson R, Burnett JP, Mayne NG, Cockerham SL, Lodge D (1998): Sulphur-containing amino acids are agonists for group 1 metabotropic receptors expressed in clonal RGT cell lines. Neuropharmacology 37(3): 277-287

Kishi S, Griener J, Cheng C, Das S, Cook EH, Pei D, Hudson M, Rubnitz J, Sandlund JT, Pui CH, and Relling MV (2003): Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia. J Clin Oncol 21: 3084-3091

Klusmann A, Fleischer W, Waldhaus A, Siebler M, Mayatepek E (2005): Influence of D-arabitol and ribitol on neuronal network activity. J Inherit Metab Dis 29: 1-3

Kraus JP, Janosik M, Kozich V, Mandell R, Shih V, Sperandeo MP, Sebastio G, de Franchis R, Andria G, Kluijtmans LA, Blom H, Boers GH, Gordon RB, Kamoun P, Tsai MY, Kruger WD, Koch HG, Ohura T, Gaustadnes M (1999): Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. Hum Mutat 13(5): 362-375

Legrand JC, Darbon P, Streit J (2004): Contributions of NMDA receptors to network recruitment and rhythm generation in spinal cord cultures. Eur J Neurosci 19(3): 521-532

Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D`Emilia DM, Rayudu PV, Arnelle DR, Stamler JS (1997): Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 94(11): 5923-5928

Lubec B, Fang-Kirchner S, Lubec T, Blom HJ, Boers GH (1996): Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. Biochim Biophys Acta 1315(3): 159-162

Ludolph AC, Ullrich K, Bick U, Fahrendorf G, Przyrembel H (1991): Functional and morphological deficits in late-treated patients with homocystinuria: a clinical, electrophysiologic and MRI study. Acta Neurol Scand 83: 161-165

Maher MP, Pine J, Wright J, Tai YC (1999): The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. J Neurosci Methods 87: 45-56

Malinow MR (1995): Plasma homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases: a mini-review. Clin Chem 41(1): 173-176

Marinou K, Antoniades C, Tousoulis D, Pitsavos C, Goumas G, Stefanadis C (2005): Homocysteine: A risk factor for coronary artery disease? Hellenic J Cardiol 46: 59-67

Matthiessen HP, Schmalenbach C, Muller HW (1989): Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin. Glia 2(3): 177-188

Mayer ML, Westbrook GL (1987): Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. J Physiol 394: 501-527

Morin F, Nishimura N, Griscom L, Lepioufle B, Fujita H, Takamura Y, Tamiya E (2005): Constraining the connectivity of neuronal networks cultured on microelectrode arrays with microelectrode arrays with microfluidic techniques: A step towards neuron-based functional chips. Biosens Bioelectron, Epub ahead of print

Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J (2001): Hyperhomocysteinemia associated with poor recall in the third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Clin Nutr 73: 927-933

Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GH, Bromberg IL, Cerone R, Fowler B, Gröbe H, Schmidt H, Schweitzer L (1985): The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Am J Hum Genet 37(1): 1-31

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984): Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. Nature 307(5950): 462-465

O`Shaughnessy TJ, Zim B, Ma W, Shaffer KM, Stenger DA, Zamani K, Gross GW, Pancrazio JJ (2003): Acute neuropharmacologic action of chloroquine on cortical neurons in vitro. Brain Res 959: 280-286

Otto F, Görtz P, Fleischer W, Siebler M (2003): Cryopreserved rat cortical cells develop functional neuronal networks on microelectrode arrays. J Neurosci Methods 128(1-2): 173-181

Otto F, Kieseier BC, Gortz P, Hartung HP, Siebler M (2005): The pentapeptide QYNAD does not inhibit neuronal network activity. Can J Neurol Sci 32(3): 344-348

Pancrazio JJ, Gray SA, Shubin YS, Kulagina N, Cuttino DS, Shaffer KM, Eisemann K, Curran A, Zim B, Gross GW, O`Shaughnessy TJ (2003): A portable microelectrode array recording system incorporating cultured neuronal networks for neurotoxin detection. Biosens Bioelectron 18(11): 1339-1347

Pancrazio JJ, Keefer EW, Ma W, Stenger DA, Gross GW (2001): Neurophysiologic effects of chemical agent hydrolysis products on cortical neurons in vitro. Neurotoxicology 22: 393-400

Potter SM, DeMarse TB (2001): A new approach to neural cell culture for long.term studies. J Neurosci Methods 110: 17-24

Refsum H, Ueland PM, Kvinnsland S (1986): Acute and long-term effects of high-dose methotrexate treatment on homocysteine in plasma and urine. Cancer Res 46(10): 5385-5391

Riggs KM, Spiro III A, Tucker K, Rush D (1996): Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. Am J Clin Nutr 63: 306-314

Robinson HP, Kawahara M, Jimbo Y, Torimitsu K, Kuroda Y, Kawana A (1993): Periodic synchronized bursting and intracellular calcium transients elicited by low magnesium in cultured cortical neurons. J Neurophysiol 70(4):1606-1616

Sakmann B, Neher E (1984): Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. Annu Rev Physiol 46: 455-472

Santhosh-Kumar CR, Deutsch JC, Kolhouse JC, Hassel KL, and Kolhouse JF (1994): Measurement of excitatory sulfur amino acids, cysteine sulfinic acid, cysteic acid, homocysteine sulfinic acid, and homocysteic acid in serum by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry and selected ion monitoring. Anal Biochem 220: 249-256

Schmalenbach C, Muller HW (1993): Astroglia-neuron interactions that promote long-term neuronal survival. J Chem Neuroanat 6(4): 229-237

Schwahn B, Kameda G, Wessalowski R, Mayatepek E (2005): Severe hyperhomocysteinaemia and 5-oxoprolinuria secondary to antiproliferative and antimicrobial drug treatment. J Inherit Metab Dis 28: 99-102

Schwahn BC, Laryea MD, Chen Z, Melnyk S, Pogribny I, Garrow T, James SJ Rozen R (2004): Betaine rescue of an animal model with methylenetetrahydrofolat reductase deficiency. Biochem J 382(Pt 3): 831-840

Schwahn BC, Wendel U, Lussier-Cacan S, Mar MH, Zeisel SH, Leclerc D, Castro C, Garrow TA, Rozen R (2004): Effects of betaine in a murine model of mild cystathionine-ß-synthase deficiency. Metabolism 53(5): 594-599

Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D`Agostino RB, Wilson PWF, Wolf PA (2002): Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer`s Disease. N Engl J Med 346(7): 476-483

Shi Q, Savage JE, Hufeisen SJ, Rauser L, Grajkowska E, Ernsberger P, Wroblewski JT, Nadeau JH, Roth BL (2003): L-homocysteine sulfinic acid and other acidic homocysteine derivatives are potent and selective metabotropic glutamate receptor agonists. J Pharmacol Exp Ther 305(1): 131-142

Sprince H, Parker CM, Josephs JA Jr (1969): Homocysteine-induced convulsions in the rat: protection by homoserine, serine, betaine, glycine and glucose. Agents Actions 1(1): 9-13

Straub B, Meyer E, Fromherz P (2001): Recombinant maxi-K channels on transistor, a prototype of ionoelectronic interfacing. Nat Biotechnol. 19(2): 114

Streck EL, Matte C, Vieira PS, Rombaldi F, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT (2002): Reduction of Na(+), K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. Neurochem Res 27(12): 1593-1598

Streit J, Tscherter A, Heuschkel MO, Renaud P (2001): The generation of rhythmic activity in dissociated cultures of rat spinal cord. Eur J Neurosci 14: 191-202

Stüwe S, Gramowski A, Weiss DG (2004): Effects of acute valproate exposure on the electrical activity of primary frontal cortex networks grown on microelectrode arrays. 4th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays, NMI Tübingen

Syndicat National des Ophtalmologistes de France (2001): L`homocystinurie. Homepage: Les Maladies, Maladies generales, Homocystinurie

Torborg C, Wang CT, Muir-Robinson G, Feller MB (2004): L-type calcium channel agonist induces correlated depolarizations in mice lacking the beta2 subunit nAChRs. Vision Res. 44(28): 3347-3355

Tschopp P, Streit P, Do KQ (1992): Homocysteate and homocysteine sulfinate, excitatory transmitter candidates present in rat astroglial cultures. Neurosci Lett. 145(1): 6-9

Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE (2001): Biological and clinical implications of the C677T polymorphism. Trends Pharmacol Sci 22(4): 195-201

Ueland PM, Refsum H (1989): Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. J Lab Clin Med 114(5): 473-501

Wuerthele SE, Yasuda RP, Freed WJ, Hoffer BJ (1982): The effect of local application of homocysteine on neuronal activity in the central nervous system of the rat. Life Sci 31(24): 2683-2691

Yaghmai R, Kashani AH, Geraghty MT, Okoh J, Pomper M, Tangerman A, Wagner C, Stabler SP, Allen RH, Mudd SH, Braverman N (2002): Progressive cerebral edema associated with high methionine levels and betaine therapy in a patient with cystathionine ß-synthase (CBS) deficiency. Am J Med Genet 108: 57-63

Zeck G, Fromherz P (2001): Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. Proc Natl Acad Sci U S A98(18): 10457-10462

Zieminska E, Stafiej A, Lazarewicz JW (2003): Role of group I metabotropic glutamate receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. Neurochem Int 43(4-5): 481-492

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Homocystinurie ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die auf Enzymdefekten im Methionin-Stoffwechsel beruht und u.a. zu einer akuten Enzephalopathie führen kann. Patienten mit Homocystinurie weisen stark erhöhte Werte von Homocystein und dessen Oxidationsprodukten Homocysteinsulphinsäure (HCSA) und Homocysteinsäure (HCA) auf. Viel häufiger ist eine milde Hyperhomocysteinämie, die auch mit neurologischen Krankheitsbildern wie z.B. Demenz assoziiert ist. Bisher ist nicht bekannt, durch welche Substanz die Störungen des zentralen Nervensystems hervorgerufen werden.

In dieser Arbeit wurden die minimalen Konzentrationen der Metabolite bestimmt, die notwendig sind, um die neuronale Netzwerkaktivität in vitro zu inhibieren.
Als Modellsystem für neuronale Netzwerkfunktion diente der Mikroelektroden-Array, auf dem primär dissoziierte Cortex-Neurone embryonaler Wistar-Ratten ein spontan aktives neuronales Netzwerk gebildet hatten.
Es wurde die Spike-Aktivität gemessen und die jeweilige Änderung der spontanen Spike-Rate nach Zugabe einer Test-Substanz berechnet. Daraus ließ sich eine Dosis-Wirkungskurve mit einer inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) ableiten. Um einen Hinweis auf den Wirkmechanismus zu erhalten, wurde zusätzlich ein NMDA-Rezeptorantagonist appliziert.

L-HCA und L-HCSA beeinträchtigten beide die neuronale Netzwerkaktivität signifikant schon in geringen Konzentrationen mit einer IC_{50} von 1,3 µmol/l (HCA) und 1,9 µmol/l (HCSA), während D,L-Homocystein eine 250-fach höhere IC_{50} von 401 µmol/l aufwies. Die Inhibition war nach Zugabe eines NMDA-Rezeptorantagonisten reversibel und wird daher vermutlich über diesen Rezeptor vermittelt.

Da die Homocystein-Werte in Patienten viel niedriger sind als die Konzentrationen, die den vorliegenden Ergebnissen zufolge die neuronale Netzwerkfunktion beeinträchtigen, spielt Homocystein bei der Pathogenese neurologischer Erkrankungen vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass L-HCA und L-HCSA schon in sehr geringen Konzentrationen einen starken Effekt auf die spontane Netzwerkaktivität ausüben. Daher ist es wahrscheinlicher, dass L-HCA und L-HCSA die akuten neurologischen Störungen bei Patienten auslösen als Homocystein selbst.

7 LEBENSLAUF

Persönliche Daten:	Name:	Annika Hoinkes
	geboren am:	30.04.1978 in Düsseldorf
Schulausbildung:	1984-1988	Grundschule Ellenbeek in Wülfrath
	1988-1997	Gymnasium Wülfrath; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Praktikum:	07/1997-12/1997	Pflegepraktikum im evangelischen Krankenhaus Mettmann
Studium:	04/1998	Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
	03/2000	Ärztliche Vorprüfung
	03/2001	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
	03/2004	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
	04/2004	Beginn des Praktischen Jahres am Universitätsklinikum Düsseldorf
	05/2005	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung
	07/2005	Ärztliche Approbation
Beruf:	seit 09/2005	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Düsseldorf

Publikation:
Gortz P, Hoinkes A, Fleischer W, Otto F, Schwahn B, Wendel U, Siebler M
Implications for hyperhomocysteinenia: not homocysteine but its oxidized forms strongly inhibit neuronal network activity. J Neurol Sci. (2004) 218: 109-114

Abstract:
Hoinkes A, Fleischer W, Otto F, Görtz P, Schwahn B, Wendel U, Siebler M (2003)
Impact of homocysteine metabolites on Neuronal Network Activity detected with Microelectrode Arrays: Implications for Neurological Disturbance in Homocystinuria.
The Neurosciences from Basic Research to Therapy, Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference, Elsner and Zimmermann, Georg Thieme Verlag 2003: 871-872

Preis:
Ursula Wachtel-Preis für das beste Poster der Tagung der Arbeitsgemeinschaft für pädiatrische Stoffwechselstörungen in Fulda 2003

8 DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor. Dr. med. Mario Siebler für die sehr gute Betreuung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Seine Begeisterung für das elektrophysiologische Experimentieren, mit der er mich schnell angesteckt hat, und seine Bereitschaft, mir in fachlichen wie persönlichen Angelegenheiten stets einen wertvollen Rat zu geben, haben mich sehr beeindruckt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Udo Wendel für die Initiation der Arbeit und das Ermöglichen meiner Teilnahme am Kongress der Gesellschaft für Angeborene Pädiatrische Stoffwechselstörungen in Fulda.

Herrn Privatdozent Dr. med. Bernd Schwahn danke ich für die Stellung des Themas und seine stets vorhandene Bereitschaft, mich sehr kompetent bezüglich biochemischer und klinischer Aspekte zu beraten. Er hat mich auch als Kinderarzt in meinem Berufswunsch gestärkt und auf seiner Station während des Praktischen Jahres gefördert.

Herrn Dr. med. Philipp Görtz bin ich für seine Hilfe bei den elektrophysiologischen Untersuchungen und der statistischen Analyse der Netzwerkdaten sehr dankbar.

Eine große Hilfe war mir die technische und moralische Unterstützung von Herrn Diplom-Physiker Stephan Theiss bei den elektrophysiologischen Messungen auch zu später Stunde. Ganz herzlich möchte ich ihm für seine stete Hilfsbereitschaft bei fachlichen und mathematisch-statistischen Fragestellungen danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Brigida Ziegler für ihre ausgezeichnete und unübertroffene Zellkulturarbeit.

Bei Frau Diplom-Biologin Wiebke Fleischer möchte ich mich vielmals für ihre engagierte und konstruktive Kritik bei der Erstellung des Manuskriptes bedanken.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des MEA-Chip-Labors, des Neurochemischen Labors und des Stoffwechsellabors der Kinderklinik für ihre alltägliche freundliche Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinem Partner für ihre bedingungslose Unterstützung und ihren selbstlosen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit in vielfacher Hinsicht.