

## Zur Biosynthese von Aminosäuren aus Glukose im Zentralnervensystem beim Parkinsonsyndrom

E. Gründig<sup>1</sup>, W. Mayer<sup>2</sup> und F. Gerstenbrand<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Medizinisch Chemisches Institut der Universität Wien, Währingerstrasse 10, A-1090 Wien,

<sup>2</sup> Neurologie in der Universitätsklinik, Innsbruck, Austria

### Biosynthesis of Amino Acids in Human Central Nervous System and Parkinsonism

**Summary.** The incorporation of labelled carbon from glucose U-<sup>14</sup>C into CSF amino acids was investigated in three patients with Parkinson's disease and in three control persons with comparable age and physical stature.

1. Comparing the specific radioactivities of serum and CSF one can postulate that the labelled amino acids found in the CSF are synthesized mainly by brain tissue.

2. The resorption of glucose into the CNS and therefore the synthesis of amino acids from glucose was more rapid in controls; labelled alanine and glutamine appeared later in the CSF of the patients.

3. As expected, in the controls the specific radioactivity of glutamic acid was found to be higher than that of glutamine, in patients the labelling of glutamine was higher as was that of serine, glycine, aspartic acid and asparagine.

From our knowledge concerning the compartmentation of the metabolism of glutamate, we assume that in Parkinsonism the metabolic activity of neurons is reduced but that of astroglia is enhanced.

**Key words:** Parkinsonism – Biosynthesis of amino acids – Metabolic activities – Neurons Astroglia

**Zusammenfassung.** Bei drei Parkinsonpatienten wurde im Vergleich zu drei dem Alter und Status entsprechenden Personen der Einbau von markiertem Kohlenstoff aus U-<sup>14</sup>C-Glukose in Liquoraminosäuren untersucht. Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Aminosäuren in Blut und Liquor zeigte, daß vorwiegend das Hirngewebe als Ursprung der markierten Arminosäuren im Liquor anzusehen ist.

2. Die Resorption der Glukose in das Zentralnervensystem und damit der Umsatz der Glukose zu Aminosäuren war bei den Kontrollpersonen rascher als bei den Patienten, was u.a. aus dem Zeitpunkt des Auftauchens von markiertem Alanin und Glutamin im Lumballiquor geschlossen werden kann.

3. Während bei den Kontrollpersonen die spezifische Aktivität der Glutaminsäure im Liquor höher war als die Markierung des Glutamins, war bei den Parkinsonpatienten die Markierung des Glutamins höher, desgleichen die Markierung von Serin und Glycin, aber auch von Asparaginsäure und Asparagin.

Auf Grund der bekannten Kompartimentierung des Glutamatstoffwechsels im ZNS zeigt dieses Ergebnis, daß bei der Paralysis agitans nicht nur – wie man bisher annahm – ein neuraler Effekt vorliegt, sondern auch gliäre Elemente an der Störung beteiligt sind. Einer verminderten metabolischen Aktivität neuronalen Gewebes steht eine gesteigerte der Astroglia gegenüber.

**Schlüsselwörter:** Parkinson'sche Krankheit – Biosynthese von Aminosäuren im Zentralnervensystem – Metabolische Aktivitäten in Neuronen und Astroglia

### Einleitung

Es wurde wiederholt berichtet, daß beim Parkinsonsyndrom unterschiedlicher Genese, so auch beim medikamentösen Parkinson, das Aminosäurespektrum des Liquor cerebrospinalis vom normalen Durchschnitt abweicht (Bruck et al. 1964; Gründig und Gerstenbrand 1970; Van Sande et al. 1971; Hare et al. 1973; Gjessing et al. 1974; Lakke and Teelken 1976).

Zur näheren Abklärung der Ursachen dieser Veränderungen wurde zunächst ein Tiermodell entwickelt, nämlich ein medikamentöses Parkinsonsyndrom bei der Ratte unter Verwendung von Phenothiazinen oder von Reserpin (Gründig und Hanbauer 1970). Die so erzielbare Abweichung der Zusammensetzung der Gehirnaminosäuren bei den Versuchstieren entsprach weitgehend derjenigen im Liquor von unbehandelten Parkinsonpatienten. Die Untersuchung der Biosynthese von Aminosäuren aus  $^{14}\text{C}$ -Glukose (U) im ZNS der Parkinson-Tiermodelle ergab, daß nach 20 min weniger  $^{14}\text{C}$ -Glutaminsäure,  $^{14}\text{C}$ -Serin und  $^{14}\text{C}$ -Glycin gebildet worden war als bei Kontrolltieren, die Syntheserate von Serin und Glycin aus unmarkierten Precursoren jedoch um ein Vielfaches zugenommen hatte (Gründig et al. 1976; Raheem et al. 1979).

Dieses Untersuchungsergebnis steht mit den Liquorbefunden bei Parkinsonpatienten, der Erhöhung der Konzentration der Aminosäuren Serin und Glycin bei gleichzeitiger Verminderung der Glutaminsäurekonzentration in Einklang.

Zur Erklärung der oben zitierten Befunde schien uns die bekannte Störung des Gleichgewichtes der Neurotransmitter bei Paralysis agitans nicht ausreichend. Um nähere Aufschlüsse über die Veränderung der Biosyntheserate der genannten Aminosäuren im ZNS von Parkinsonpatienten zu gewinnen, vor allem aber um zusätzliche Erkenntnisse über Umfang und Lokalisation der metabolischen Defekte zu erhalten, mit dem Ziel einer Erweiterung und Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten, war es notwendig, weitere Untersuchungen durchzuführen.

### Methodik

In die Untersuchungen wurden ein weibliches und zwei männliche Patientenpaare im Alter zwischen 60 und 65 Jahren einbezogen. Je ein Patient litt an einem nicht therapierten

Parkinsonsyndrom. Bei den freiwilligen Kontrollpersonen bestanden keinerlei extrapyramidalen Krankheitssymptome. Alle Patienten waren von der Art und dem genauen Ablauf sowie dem Zweck der Untersuchung in allen Details unterrichtet worden.

Jeder nüchterne Proband erhielt  $12,5 \mu\text{Ci}/\text{kg}$  U- $^{14}\text{C}$ -Glukose der Fa. Amersham (England) – steril in 15 ml blutisotoner Kochsalzlösung gelöst – in die rechte Armvene injiziert. Eine bzw. drei min nach der Injektion wurde die erste Blutprobe aus der linken Armvene entnommen. Weitere Blutabnahmen erfolgten in einstündigem Abstand bis 5 h nach Beginn der Untersuchung. Während des Untersuchungsablaufes sind außer ungesüßtem Tee und Mineralwasser keine Speisen verabreicht worden. Nach vier oder fünf Stunden wurde eine Lumbalpunktion durchgeführt. Harn wurde während der ersten 5 h in zweistündigen Perioden gesammelt, hierauf bei 2 Probandenpaaren bis 24 h nach Beginn der Untersuchung in vierstündigen Perioden.

Zur Messung der Gesamtaktivität wurden 0,1 ml der Körperflüssigkeit mit 15 ml Brayscher Lösung versetzt und die Radioaktivität im Liquid-Szintillationszähler (Isocap, Fa. Nuclear Chicago) gezählt.

Zur Bestimmung der Konzentration und der Radioaktivität der Summe aller Aminosäuren wurden Liquor und Serum mit 10%iger TCE enteiweißt, der Niederschlag mit 5%iger TCE gewaschen und die vereinigten Überstände ausgeäthert. Der eiweißfreie Überstand bzw. der Harn wurden auf pH 1 gebracht, die Aminosäuren durch Filtration über Dowex 50  $\times 4$  ( $\text{H}^+$ -Form) abgetrennt. Es wurden ausschließlich Röhrchen aus Polycarbonat verwendet, um eine Bindung von Aminosäuren an die Gefäßwand zu vermeiden. Die Konzentrationsmessung erfolgte aus einem aliquoten Teil nach Moore und Stein (1948) sowie auch nach Pantlitschko und Gründig (1958) – durch Tüpfeln auf Papier bei pH 5–6, Anfärben mit Ninhydrin, Elution der einzelnen Felder ( $30 \times 30$  mm) mit alkoholischer Kupfernitratlösung und photometrischer Messung des Extraktes bei 504 nm. Die Radioaktivität wurde aus einem weiteren Aliquot im Liquid-Szintillationszähler bestimmt. Es wurden ebenfalls ausschließlich Kunststoffgefäß verwendet, sowie darauf geachtet, daß der pH-Wert der zu messenden Lösung stets  $3,0 \pm 0,1$  betrug (vergl. Gaitonde und Nixey 1972).

Zur Trennung der Aminosäuren wurde ein automatischer Aminosäurenanalysator (TSM-1, Fa. Technikon Frankfurt/Main) eingesetzt und ein Kurzprogramm entwickelt. Es wurden Konzentration und Radioaktivität gesondert in jeweils aufeinanderfolgenden Läufen bestimmt. Zur Messung der Radioaktivität wurde eine bestimmte Tropfenzahl gesammelt, die Richtigkeit der Lokalisation durch Tüpfeln auf Papier und Färben mit Ninhydrin überprüft, der Rest der Lösung auf pH  $3,0 \pm 0,1$  gebracht und die Radioaktivität eines Aliquots mit Hilfe von Brayscher Lösung gemessen. Zur Konstanzhaltung der Tropfengröße wurde die Zusammensetzung der Elutionspuffer mit Ausnahme des pH-Wertes konstant gehalten. Es ist zu beachten, daß  $^{12}\text{C}$ -Aminosäuren und  $^{14}\text{C}$ -Aminosäuren nicht gleichzeitig eluiert werden; die Verschiebung betrug jeweils 1–2 Röhrchen im Fraktionskollektor (vergl. Gaitonde und Nixey (1972)). Gemessen wurden Asparaginsäure, Asparagin, Serin, Glycin, Glutaminsäure, Glutamin und Alanin.

Die Konzentrationen von Harnstoff und Kreatinin im Harn wurden mit Testpacks der Fa. Boehringer bestimmt, ebenso Glukose in Serum und Liquor.

Für die Einzelaminosäuren wurden die Konzentrationen aus den Flächen unter den Peaks der Aminogramme mit Hilfe der Dreiecksmethode ermittelt, die Radioaktivitäten durch Addition der den einzelnen Aminosäuren entsprechenden Fraktionen, ein Verfahren, das infolge der vollständigen Trennung der Peaks möglich war. Die Summe der Radioaktivitäten der Aminosäuren Asparaginsäure, Asparagin, Serin, Glycin, Glutaminsäure, Glutamin und Alanin betrug zwischen 86% und 93% der für die Summe aller Aminosäuren gefundenen Werte.

Auf eine Berechnung der Signifikanz der Ergebnisse wurde wegen der geringen Probandenzahl weitgehend verzichtet, und nur bei einigen Fragestellungen der *t*-Test angewendet. Der Variationskoeffizient für die quantitative Bestimmung der Aminosäuren liegt innerhalb der 5% Grenze, die Wiederfindungsrate für zugesetzte  $^{14}\text{C}$ -Aminosäuren betrug zwischen  $97 \pm 4\%$  für U- $^{14}\text{C}$ -Serin und  $94 \pm 5\%$  für 1- $^{14}\text{C}$ -Glutaminsäure.

**Tabelle 1.** Mittlere Konzentrationen der markierbaren Aminosäuren und der Glukose in Serum und Liquor der untersuchten Personen  $\bar{x} \pm S.D.$ )

	Serum ( $\mu\text{mol/l}$ ) $N=24$	Liquor ( $\mu\text{mol/l}$ ) $N=6$	Konzentrationsverhältnis	
	Quotient $^c\text{Serum}/$ $^c\text{Liquor}$ $\bar{x} \pm S.D.$	Durchschnittliches Verhältnis $^c\text{Serum}/^c\text{Liquor}$		
Asp	36 $\pm$ 7,5	2,2 $\pm$ 0,76	17 $\pm$ 3,6	1 : 0,06
Glu	180 $\pm$ 144	61 $\pm$ 5,3	3,1 $\pm$ 0,10	1 : 0,32
Ser	159 $\pm$ 40	25 $\pm$ 5,8	6,9 $\pm$ 1,40	1 : 0,14
Gly	235 $\pm$ 52	9,4 $\pm$ 2,30	28 $\pm$ 6,2	1 : 0,04
Asn	55 $\pm$ 24,8	8,8 $\pm$ 2,56	6,2 $\pm$ 2,23	1 : 0,16
Gln	201 $\pm$ 33	240 $\pm$ 87	0,9 $\pm$ 0,40	1 : 1,06
Ala	367 $\pm$ 62	35 $\pm$ 7,7	11 $\pm$ 2,4	1 : 0,09
Glukose	4370 $\pm$ 220	3240 $\pm$ 180	1,35 $\pm$ 0,08	1 : 0,74

## Ergebnis

Die biologische Halbwertszeit des in Form von U- $^{14}\text{C}$ -Glukose verabreichten  $^{14}\text{C}$  im Serum lag bei den Probanden zwischen 148 und 156 min, woraus sich ergibt, daß die Aktivität im Serum innerhalb von 24 h (9,6 Halbwertszeiten) um 3 Zehnerpotenzen (1/890) abgenommen hatte. Die Verteilung des  $^{14}\text{C}$  im Organismus, d.h. der Eintritt des steady state dauerte 70 min (vergl. Baker et al. 1954).

Innerhalb der ersten 24 h wurden im Harn bei den Vergleichspersonen 4,3% bzw. 4,1% der verabreichten Aktivität ausgeschieden, bei den Parkinson-Patienten 3,8% bzw. 3,3%, die Hauptmenge aber abgeatmet (vergl. Sacks 1957, 1965). Bei einem Probandenpaar wurde die Untersuchung nach 6 h beendet. Die Menge des im Harn ausgeschiedenen  $^{14}\text{C}$  nahm im Verlauf des Tages ab: Innerhalb der ersten 4 h wurden 45%–63% der Tagesmenge, innerhalb der letzten Meßperiode (18–24 h) 5%–7% Tagesmenge  $^{14}\text{C}$  abgegeben.

### Serum-Aminosäuren

Die Konzentrationen der markierbaren Aminosäuren im Serum blieben während der Meßdauer von 5 h bis zur Einnahme der ersten Mahlzeit innerhalb der zu erwartenden biologischen Streuung ebenso konstant wie die Glukosekonzentration (Tabelle 1). Eine Minute nach Injektionsbeginn konnte noch keine Markierung von Aminosäuren nachgewiesen werden. Nach 3 min waren im Durchschnitt 0,3% nach 1 h 1,1% nach 3 h 2,5% und nach 5 h 3,3% der Gesamtaktivität in Aminosäuren gebunden. Im Ausmaß der Markierung von Serum-Aminosäuren konnte kein Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen gefunden werden, ebensowenig in der Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Aminosäuren: nach 3 h beispielsweise war 76%–86% der Aktivität in den 3 Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure und Glutamin gebunden, nach 5 h 88%–90%, der Rest im wesentlichen in Asparaginsäure, Asparagin, Serin und Glycin.

**Tabelle 2.** Konzentration und spezifische Aktivität der Summe aller markierbaren Aminosäuren im Liquor bei den untersuchten Personen. (P=Patient, K=Kontrolle)

	4 h nach Verabreichung der Glukose		5 h nach Verabreichung der Glukose			
	P1	K1	P2	P3	K2	K3
Amino-Stickstoff mmol/l	0,37	0,38	0,31	0,34	0,36	0,33
dpm/mmol Amino- Stickstoff $\times 10^{-6}$	2,6	4,0	4,1	4,0	2,9	2,8

**Tabelle 3.** Der Unterschied der spezifischen Aktivitäten der Liquoraminosäuren zwischen Patienten und Kontrollen, ausgedrückt durch den Quotienten spezifische Aktivität im Patientenliquor/ spezifische Aktivität im Kontrollliquor

	1 Probandenpaar 4 h p.i.	$\bar{x}$ von 2 Probandenpaaren 5 h p.i.
Asp	1,6	1,5
Glu	0,8	0,9
Ser	2,1	10,2
Gly	2,9	4,8
Asn	7,7	3,1
Gln	0,2	5,5
Ala	0,5	3,0

Am schnellsten markiert wurden im Serum bei allen Probanden Asparaginsäure und Alanin. Die maximale spezifische Aktivität der Summe aller Aminosäuren wurde im Zeitpunkt zwischen 2 und 3 h gefunden und betrug ca.  $10^6$  dpm/mmol Aminostickstoff. Zu diesem Zeitpunkt war die spezifische Aktivität der Asparaginsäure höher als die des Asparagins, diejenige des Glutamins aber höher als die der Glutaminsäure. Nach 5 h waren Säuren und Säureamide gleich markiert.

Die spezifischen Aktivitäten des Serins waren stets höher als die des Glycins. Die spezifische Aktivität des Serum-Alanins war bei den Vergleichspersonen höher als bei den Patienten.

### Liquor-Aminosäuren

Einen Überblick über Konzentrationen und Radioaktivitäten der Aminosäuren im Liquor gibt Tabelle 2. Daraus ist ersichtlich, daß die Dynamik der Aufnahme des  $^{14}\text{C}$  ins ZNS bei beiden Gruppen unterschiedlich war, d.h., daß die Resorption und damit der Umsatz des  $^{14}\text{C}$  bei den Kontrollen schneller verlaufen dürfte.

Verschieden verhielten sich auch beide Gruppen, wenn man die Liquor-Aminosäuren aufschlüsselt. Die spezifische Aktivität der Glutaminsäure hatte bei beiden Gruppen dasselbe Ausmaß, die Markierung des Glutamins war jedoch bei den Patienten höher, wenn auch der Effekt infolge der langsameren

**Tabelle 4.** Relation der spezifischen Aktivitäten der Serum – und Liquor-Aminosäuren bei den untersuchten Personen. Angegeben ist der Quotient aus spezifischer Aktivität der Aminosäure im Liquor nach 4 (P1, K1) bzw. 5 h (P2, P3, K2, K3) und der höchsten während der Versuchsdauer von 6 h im Serum gemessen spezifischen Aktivität derselben Aminosäure (Der Zeitpunkt in Stunden der höchsten gemessenen Aktivität im Serum ist in Klammer gesetzt)

	Patienten			Kontrollen		
	P1	P2	P3	K1	K2	K3
Asp	5,1 (2)	2,5 (3)	3,5 (3)	1,3 (0,05)	2,6 (3)	1,4 (0,05)
Glu	1,0 (2)	1,0 (3)	1,1 (3)	2,4 (2)	2,9 (3)	3,1 (3)
Ser	7,7 (4)	2,7 (3)	5,5 (3)	1,6 (2)	1,2 (3)	0,2 (2)
Gly	11,5 (2)	4,3 (3)	5,8 (4)	1,0 (2)	0,5 (3)	0,3 (2)
Asn	11,5 (2)	11,0 (3)	6,0 (3)	0,4 (2)	0,5 (3)	1,1 (0,05)
Gln	2,3 (2)	1,5 (3)	3,5 (3)	1,9 (2)	2,7 (3)	1,5 (3)
Ala	0,4 (2)	1,0 (3)	1,0 (3)	0,3 (3)	0,3 (3)	0,3 (2)

Passage erst nach 5 h nachweisbar wurde. So verhielt sich, wie erwartet, das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten Glutaminsäure / Glutamin bei den Kontrollen wie 3,1 : 1, bei den Patienten aber wie 0,67 : 1.

Ferner ist aus Tabelle 3 zu entnehmen, daß die Markierung von Serin und Glycin, aber auch von Asparaginsäure und Asparagin bei den Patienten nach 4 und nach 5 h höher als bei den Vergleichspersonen war. Bei den Patienten stieg die Markierung speziell von Alanin und Glutamin langsamer an als bei den Kontrollen, diejenige des Asparagins schneller; kein Unterschied in Ausmaß und Geschwindigkeit der Markierung wurde bei Glutaminsäure gefunden.

Zur Abschätzung der Frage, ob die markierten Aminosäuren vorwiegend aus dem Serum durch Diffusion in den Liquor gelangt sein könnten oder aber weitgehend aus dem ZNS stammen, setzt Tabelle 4 die spezifischen Aktivitäten der Serum- und Liquoraminosäuren in Relation. Markiertes Alanin könnte auch vorwiegend aus dem Blut stammen. Ursprung der übrigen markierten Aminosäuren dürfte jedoch vorwiegend das ZNS sein, weil die spezifischen Aktivitäten der Liquoraminosäuren höher als die der Serumaminosäuren waren. Die relativ geringere Markierung von Glutaminsäure bei Patienten und von Serin, Glycin sowie Asparagin bei Kontrollen dürfte auf geringere Syntheseraten dieser Aminosäuren im ZNS zurückzuführen sein.

#### Harn-Aminosäuren

Wie oben erwähnt, wurden weniger als 5% des aus der Glukose stammenden  $^{14}\text{C}$  im Harn ausgeschieden. Von der jeweils im Harn gemessenen Aktivität entfielen bei den Patienten während der Nüchternperiode (0-5 h) im Mittel  $0,6 \pm 0,22\%$  auf Aminosäuren, bei den Kontrollen  $0,3 \pm 0,24\%$  d.h. daß die Streuung außerordentlich hoch war und aus den Resultaten kein Unterschied zwischen beiden Gruppen abgeleitet werden kann. Die ausgeschiedenen Mengen an Aminosäuren waren im Beobachtungszeitraum ebenfalls bei allen Probanden weitgehend konstant.

**Tabelle 5.** Verteilung des in Aminosäuren gebundenen  $^{14}\text{C}$  im Harn während der ersten Stunden; Mittelwerte von jeweils 3 Personen. Die Aktivität der Summe aller Aminosäuren wurde gleich 1,00 gesetzt.

	Patienten			Kontrollen		
	0-1 h	2-3 h	4-5 h	0-1 h	2-3 h	4-5 h
Asp	0,02	0,03	0,04	0,09	0,02	0,02
Glu	0,10	0,12	0,08	0,12	0,09	0,03
Ser	0,12	0,11	0,11	0,13	0,05	0,04
Gly	0,16	0,18	0,29	0,12	0,15	0,20
Asn	0,06	0,06	0,11	0,03	0,06	0,01
Gln	0,27	0,11	0,11	0,06	0,09	0,16
Ala	0,28	0,43	0,26	0,46	0,54	0,54

Die Aufschlüsselung der Aminosäuren (Tabelle 5) – wegen der hohen individuellen Streuung wurden die Werte jeweils auf die gesamte in Aminosäuren gebundene Aktivität bezogen – zeigt jedoch, daß eine unterschiedliche Dynamik in Synthese und Abbau bei beiden Probandengruppen nicht auszuschließen ist. Beispielsweise wurde bei den Patienten ein größerer Anteil der Glukose über Asparagin und Glutamin metabolisiert, bei den Vergleichspersonen über Alanin. Auch scheint die Umsetzung Serin – Glycin bei den Patienten höher gewesen zu sein.

## Diskussion

Es ist bekannt, daß im ZNS etwa zehnmal mehr Blutglukose über Aminosäuren metabolisiert wird, als in anderen Geweben. Über 80% des Amino-N entfallen auf Glutaminsäure, Asparaginsäure,  $\gamma$ -Aminobuttersäure, Glycin, Serin, Alanin und Threonin (Gründig et al. 1976; Gaitonde et al. 1965; Schimada et al. 1973; Whittaker 1968). Deshalb erschien es uns aussichtsreich, auch bei geringer Dosierung von  $^{14}\text{C}$ -Glukose Aufschluß über Unterschiede in den Stoffwechselwegen auffinden zu können.

Obwohl die Konzentration von Metaboliten im Lumballiquor von mehreren dynamischen Größen abhängt, dürften die Liquor Aminosäuren weitgehend aus dem Stoffwechsel des ZNS stammen (Baxter 1976). Für diese Ansicht spricht, daß der Aminosäureaustausch Blut – Liquor unter physiologischen Bedingungen quantitativ unbedeutend ist (Weichert 1963), daß bei Versuchstieren die Aufnahmerate von Aminosäuren aus dem Blut in der Größenordnung von etwa  $\frac{1}{10}$  derjenigen von Glukose ist (Oldendorf 1971), und daß die Glutaminsynthese in der Astroglia den Bedarf übersteigt, sodaß ein Nettoflux ZNS – Blut resultiert (Hills et al. 1967). Als Zeitpunkt der Liquorentnahme wählten wir 4–5 h nach Verabreichung der Glukose, weil dies der früheste Zeitpunkt ist, zu dem vom Hirngewebe synthetisierte Metabolite im Lumballiquor in entsprechender Konzentration vorliegen können (Gründig et al. 1963).

In der vorliegenden Arbeit wurde beschrieben, daß bei den Kontrollen im Liquor die spezifische Aktivität der Glutaminsäure höher war als die des Glutamins, ein Befund, der im Hinblick auf die „Kompartimentierung“ des Glutaminsäurestoffwechsels im ZNS zu erwarten war (Baxter 1976; Gaitonde et al. 1965; Cremer 1964; Van den Berg et al. 1966, Lindsay und Bachelard 1966, Berl und Clarke 1969). Bei den Parkinson-Patienten war aber die Markierung des Glutamins höher als diejenige der Glutaminsäure, ein Ergebnis, das zunächst überraschte.

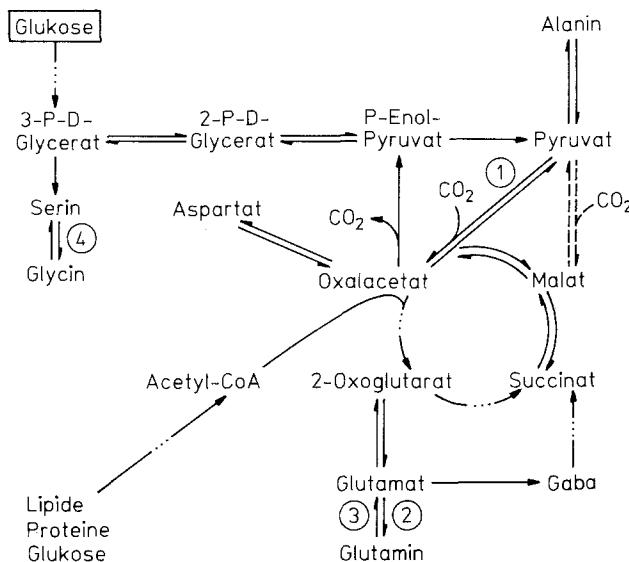
Zur Unterscheidung der Kompartimente wurden ursprünglich die biochemischen Ergebnisse mit Hilfe eines Computermodells simuliert (Garfinkel 1970; Van den Berg und Garfinkel 1971) und errechnet, daß es mindestens 2 miteinander gekoppelte kommunizierende Glutaminsäurepools geben müsse. Nach neueren Arbeiten (Rose 1967, 1968; Minchin 1977; Tursky und Lassanova 1977; van Gelder und Drujan 1980; Gordon et al. 1982; Hamberger et al. 1981; Shank und Aprison 1981) ist ein „großer“ Pool mit hoher Fluxrate in den Neuronen lokalisiert; Glutaminsäure wird bevorzugt aus Glukose als Precursor synthetisiert. Das morphologische Substrat des „kleinen“ Pools wird in der Astroglia gesehen; letztere besitzt eine Glutaminsynthetase hoher Aktivität, eine hohe Aufnahmgeschwindigkeit für Glutamat aus dem Extrazellulärraum und die Fähigkeit zur Speicherung von Glutamin.

Zusätzlich besitzt die Astroglia eine enzymatische Ausstattung, die aus Ketosäuren, C<sub>2</sub>-Komponenten (z.B. <sup>14</sup>C-Acetat) und anderen Aminosäuren ebenfalls Glutamat und damit Glutamin synthetisieren kann. Daher ist in diesem Kompartiment nach <sup>14</sup>C-Acetat als Precursor Glutamin stärker markiert als Glutaminsäure. Neuerdings wird ein drittes Kompartiment postuliert, morphologisch vermutlich neuronal, das eine hohe Glutaminaseaktivität besitzt, die Hauptquelle für die als Neurotransmitter fungierenden Aminosäuren Glutamat, GABA und Aspartat darstellt; diese Verbindungen würden aber nur in kleiner Menge synthetisiert und vermutlich in Vesikeln gespeichert. Quantitativ betrachtet würden daher die Bildungsraten bzw. Konzentrationen von Glutamin, GABA und Aspartat ein Maß für gliäre, die von Glutamat für neuronale metabolische Aktivität darstellen.

Interpretiert man unser Ergebnis unter Berücksichtigung der oben erläuterten Kompartimentierung des Glutamatstoffwechsels, bietet sich der folgende Schluß an: Der enzymatische Prozeß, der aus Glukose im neuronalen Gewebe Glutaminsäure synthetisiert, dürfte bei den Parkinson-Patienten nicht beeinflußt sein, weil die spezifische Aktivität der Glutaminsäure bei Parkinson-Patienten und Kontrollpersonen gleich war. Da die Konzentration der Glutaminsäure aber bei den Parkinson-Patienten meistens geringer ist als bei den Kontrollen, ist bei den ersten eine geringere Aufnahmgeschwindigkeit der Glukose in neuronale Strukturen nicht auszuschließen. Hingegen scheint bei den Parkinson-Patienten die Astroglia sehr aktiv zu sein: Einerseits kommt es zur Akkumulation von hoch markiertem Glutamin, sowie zu einer höheren Markierung von Asparaginsäure (und Asparagin). Andererseits finden sich bei Parkinson-Patienten eine höhere Konzentration und Markierung des Serins (und damit des Glycins). Die wird plausibel, wenn gleichzeitig eine höhere CO<sub>2</sub>-Fixierung postuliert wird.

Die CO<sub>2</sub>-Fixierung im ZNS erfolgt überwiegend durch die Pyruvatcarboxylase (Patel 1974) in den Astrozyten (Shank and Aprison 1981). Die vermehrte Syntheserate von Serin (und Glycin) dürfte daher ebenfalls auf eine erhöhte metabolische Aktivität der Astroglia zurückzuführen sein (Übersicht: vergl. Abb. 1).

Nimmt man an, daß unser einleitend erwähntes Tiermodell für den Parkinsonismus tatsächlich die bei Paralysis agitans vorliegenden Stoffwechseldefekte



**Abb. 1.** 1. Pyruvatcarboxylase; 2. Glutaminsynthetase; 3. Glutaminase; 4. Serinhydroxymethyltransferase

simulierte, wäre das in der Einleitung zitierte Ergebnis unseres Tierversuchs ein weiterer Hinweis für eine Aktivierung der  $\text{CO}_2$ -Fixierung. Denn vor Eintritt des steady state für  $^{14}\text{C}$  (nach 20 min) muß einer vermehrten Synthese von Serin (Bildung von 3-P-D-Glycerat etc. über den Weg der  $\text{CO}_2$ -Fixierung) mehr Serin mit geringerer Markierung entstehen, da ja auch vermehrt unmarkierte Pércursores vorhanden sind (Gründig et al. 1976). Nach Eintritt des steady state (ab etwa 70 min) muß dann die Markierung des Serins ebenfalls ansteigen. Da Glycin vorwiegend aus Serin synthetisiert wird (Shank 1973), gehen Konzentrations- und Markierungsänderungen der beiden Aminosäuren stets parallel, wobei die spezifische Aktivität des Glycins immer geringer sein wird als die des Serins. Postuliert man (s.o.) bei Parkinson Erkrankung einen verminderten Influx von Glukose in Neurone und damit eine geringere Glutaminsynthese im „großen Pool“, so ist folgerichtig auch eine verminderte Wiederaufnahme von Glutamin aus den gliären Elementen in jenes neuronale Kompartiment anzunehmen, in dem die Synthese der Neurotransmitter-Aminosäuren stattfindet. Diese Hypothese würde entweder einen Membrandefekt implizieren oder aber einen massiven Verlust an Neuronen. Als Folge dieser Vorgänge müßte die metabolische Aktivität der Glia zunehmen. Tatsächlich gelang es Tursky et al. (1979) in Cortex Schnitten an Versuchstieren nach experimentell ausgelöster Verminderung von Neuronen mit gleichzeitiger Proliferation der Astroglia eine verminderte Synthese von  $^{14}\text{C}$ -Aminosäuren aus Glukose bei gleichzeitiger Steigerung der Aminosäuresynthese aus  $^{14}\text{C}$ -Acetat nachzuweisen.

Da im ZNS eine direkte Kontrolle der Dopaminfreisetzung durch glutaminerge Neurone erfolgen soll (Giorgniew et al. 1977), und man Hinweise dafür besitzt, daß beim Parkinson-Syndrom des Menschen neben dem verminderten Gehalt an Catechol-Transmittern in bestimmten Strukturen auch eine Störung

des gabaergen Systems vorliegt (Rinne et al. 1974; Birkmeyer and Riederer 1980), kommt einer Dysfunktion des Glutamatcyclus große Bedeutung zu.

Beim medikamentösen Parkinson-Syndrom des Menschen, aber auch der Versuchstiere, ausgelöst durch Reserpin oder Phenothiazine (Gründig und Hanbauer 1970; Selbach 1963), ist wegen der Reversibilität kaum an eine morphologische Veränderung zu denken. Da die genannten Substanzen u.a. die Sekretion von ACTH stimulieren (Bhattacharya und Marks 1969), könnte die vermehrte Serinsynthese auf eine gesteigerte Bildung von Glucocorticoiden zurückzuführen sein.

Zuletzt sei die Frage aufgeworfen, ob eine gesteigerte Serinsynthese und damit Glycinfbildung die Hydroxylierung des Tyrosins beeinflussen kann. Sowohl die Reaktion Serin – Glycin als auch die Hydroxylierung von Tyrosin zu L-Dopa benötigen Pteridine als Cofaktoren. Für die Tyrosinhydroxylase ist Tetrahydrobiopterin der Cofaktor (Brennemann und Kaufmann 1964; Ellenbogen et al. 1965) für die Serinhydroxymethyltransferase ein Tetrahydrofolat. Wie eigene Untersuchungen zeigten (Gründig et al. 1983), funktionieren aber in vitro – mit geringerer Aktivität – beide Enzyme mit den jeweils „falschen“ Cofaktoren. Unter bestimmten Versuchsbedingungen beeinflussen in vitro höhere Serinkonzentrationen die Hydroxylierung des Tyrosins negativ, so daß ein entsprechender Effekt auch in vivo nicht auszuschließen ist. Damit wäre die von uns gemessene gesteigerte Serinsynthese und dessen vermehrter Abbau zu Glycin ein weiterer hemmender Faktor der Tyrosinhydroxylierung und damit der Synthese der Catecholamine im ZNS.

## Literatur

- Baker N, Shreeve WW, Shioley RA, Incefy GE, Miller M (1954) C-14-Studies in carbohydrate metabolism I. The oxydation of glucose in normal human subjects. *J Biol Chem* 211: 575–592
- Baxter CF (1976) Intrinsic amino acid levels and the blood–brain barrier. In: Lajtha A, Ford DH (eds) *Progress in Brain Research*, Elsevier, Amsterdam 29: 429–444
- Van den Berg CJ, Garfinkel D (1971) A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem J* 123: 211–218
- Van den Berg CJ, Mela P, Waelsh H (1966) On the contribution of the tricarboxylic acid cycle to the synthesis of glutamate, glutamine and aspartate in brain. *Biochem Biophys Res Comm* 23: 479–484
- Berl S, Clarke DD (1969) Compartmentation of amino acid metabolism. In: Lajtha A (ed) *Handbook of Neurochemistry*, vol 2. Plenum Press, New York, pp 465–469
- Bhattacharya AN, Marks BH (1969) Reserpine and chlorpromazine-induced changes in hypothalamo-hypophyseal-adrenal system in rats in the presence and absence of hypothermia. *J Pharmacol Exp Ther* 165: 108–116
- Birkmeyer W, Riederer P (1980) Die Parkinsonkrankheit, Biochemie, Klinik, Therapie. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Brennemann R, Kaufman S (1964) The role of tetrahydropteridines in the enzymatic conversion of tyrosine to 3,4-dihydroxyphenylalanine. *Biochem Biophys Res Comm* 17: 177–183
- Bruck H, Gerstenbrand F, Gründig E, Teuflmayr R (1964) Über Ergebnisse von Liquoranalysen beim Parkinsonsyndrom. *Acta Neuropathol* 3: 638–644
- Cremer JE (1964) Amino acid metabolism in rat brain studied with 14-C-labelled glucose. *J Neurochem* 11: 165–185

- Ellenbogen L, Taylor RJ jr, Brundage GB (1965) On the role of pteridines as cofactors for tyrosine hydroxylase. *Biochem Biophys Res Comm* 19 : 708-715
- Gaitonde MK, Dahl DR, and Elliott KAC (1963) Entry of glucose carbon into amino acids of rat brain and liver in vivo after injection of uniformly 14-C-labelled glucose. *Biochem J* 94 : 345-352
- Gaitonde MK, Nixey RWK (1972) Sources of error in the determination of specific radioactivity of amino acids isolated by ion-exchange-chromatography. *Anal Biochem* 50 : 417-429
- Garfinkel D (1970) Simulation study of brain compartments. I. Fuel sources and GABA metabolism. *Brain Res* 23 : 387-408
- Van Gelder NM, Drujan BD (1980) Alteration in the compartmentalized metabolism of glutamic acid with changed cerebral conditions *Brain Res* 200 : 443-445
- Giorgniew MF, Kemel ML, Glowinski J (1977) Presynaptic effect of L-glutamic acid on the release of dopamine in rat striatal slices. *Neurosci Letters* 6 : 73-77
- Gjessing LR, Gjesdahl P, Dietrichsen P, Presthus J (1974) Free amino acids in the cerebrospinal fluid in old age and in Parkinson's disease. *Europ Neurol* 12 : 33-37
- Gordon RD, Hunt A, Patel AJ (1981) The cellular distribution of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation of glutamate. *Biochem Soc Trans* 9 : 115-116
- Gründig E, Ernsthausen U, Mayer W (1983) The influence of amino acids on the activity of the tyrosine hydroxylase in rat brain preparations. Eingereicht bei *Experientia*
- Gründig E, Gerstenbrand F (1970) Über den Zusammenhang zwischen der Parkinson-symptomatik und einer Störung des Aminosäurehaushaltes im ZNS. *Klin Wochenschr* 83 : 811-816
- Gründig E, Hanbauer I (1970) Gehirn - Aminosäuren beim Phenothiazin-Parkinsonoid. Das medikamentöse Parkinsonoid bei der Ratte als Modell für biochemische Untersuchungen des Parkinsonsyndroms. *J Neurochem* 17 : 215-220
- Gründig E, Abdel Raheem K, Salvenmoser F, Schedl R, Weiß J (1976) Drug induced Parkinsonism in the rat—a model for biochemical investigation of the Parkinson-Syndrome. The incorporation of D-glucose-14-C (U) in amino acids of brain and liver from rats, pretreated with reserpine or with phenothiazines. *Psychopharmacology* 47 : 111-118
- Gründig E, Salvenmoser F, Bretschneider R (1963) Über den Einfluß der Glutaminsäure auf den Stoffwechsel, speziell des Zentralnervensystems. *Z Ges Exp Med* 137 : 94-107
- Hamberger A, Jakobson I, Lindroth P, Mopper K, Nyström B, Sandberg M, Molin SO, Svenberg U (1981) Neuron-glia interactions in the biosynthesis and release of transmitter amino acids. *Adv Biochem Psychopharmacol* 29 : 509-518
- Hare TA, Beasley BL, Chambers RA, Boehme DH, Vogel WH (1973) Dopa and amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease before and during treatment with L-Dopa. *Clin Chim Acta* 45 : 273-280
- Hills AG, Reid EL, Kerr WD (1972) Circulatory transport of L-Glutamine in fasted mammals, cellular Sources of urine ammonia. *Am J Physiol* 223 : 1470-1476
- Lakke JWF, Teelken AW (1976) Amino acid abnormalities in cerebrospinal fluid of patients with parkinsonism and extrapyramidal disorders. *Neurology* 26 : 489-493
- Lindsay TR, Bachelard HS (1966) Incorporation of 14-C- from glucose into  $\alpha$ -keto acids and amino acids in rat brain and liver in vivo. *Biochem Pharmacol* 15 : 1045-1052
- Minchin MCW (1977) The release of amino acids synthesised from various compartmented precursors in rat spinal cord slices. *Exp Brain Res* 29 : 515-526
- Moore S, Stein WH (1948) Photometric ninhydrin for use in the chromatography of amino acids. *J Biol Chem* 176 : 367-388
- Oldendorf WH (1971) Brain uptake of radiolabelled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol* 221 : 1629-1639
- Pantitschko M, Gründig E (1958) Über die Aminosäurezusammensetzung von trypsin-resistenten Phosphopeptiden aus  $\alpha$ -Casein. *Monatsh Chem* 89 : 274-284
- Patel MS (1974) The relative significance of CO<sub>2</sub>-fixing enzymes in the metabolism of rat brain. *J Neurochem* 22 : 717-724

- Raheem Abdel K, Gründig E, Salvenmoser F, Schedl R, Weiß J (1979) Incorporation of U-14-C-glucose into metabolites of brain, liver and blood of rats, pretreated with reserpine or phenothiazines. *J Clin Chem Clin Biochem* 17: 341-348
- Rinne UK, Laaksonen H, Riekkinen P, Sonninen v (1974) Brain glutamic acid decarboxylase activity in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 12: 13-19
- Rose SPR (1967) Amino acid metabolism in isolated neuronal and glial cells. *Biochem J* 102: 21P
- Rose SPR (1968) Glucose and amino acid metabolism in isolated neuronal and glial cell fractions in vitro. *J Neurochem* 15: 1415-1429
- Sacks W (1957) Cerebral metabolism of isotopic glucose in normal human subjects. *J Appl Physiol* 10: 37-44
- Sacks W (1965) Cerebral metabolism of doubly labelled glucose in humans in vivo. *J Appl Physiol* 20: 117-130
- Van Sande M, Caers J, Lovental A (1971) Cerebrospinal fluid amino acids in extrapyramidal disorders before and after L-Dopa treatment. *Z Neurol* 199: 24-29
- Selbach H (1963) Über regulationsdynamische Wirkungsgrundlagen der Psychopharmaka in anthropologischen und naturwissenschaftlichen Grundlagen der Pharmako-Psychiatrie. Thieme, Stuttgart
- Shank RP, Aprison MH (1981) Present status and significance of the glutamic cycle in neuronal tissue. *Life Sci* 28: 837-842
- Shank RPS, Aprison MH, Baxter CF (1973) Precursors of glycine in the nervous system: comparison of the specific activities in glycine and other amino acids after administration of U-14-C-serine or 1,5-14-C-citrate to the rat. *Brain Res* 52: 301-308
- Shimada M, Kibara T, Kuritomo K, Watanabe M (1973) Incorporation of 14-C- from (U-14-C-D-) glucose into free amino acids in mouse brain loci in vivo under normal conditions. *J Neurochem* 20: 1337-1344
- Tursky T, Lassanova M (1977) On the localisation of the two glutamate pools in the brain. Comparison of their metabolic activities in human and rat brain tissue in vitro. *Physiol Bohemoslovaca* 26: 201-208
- Tursky CT, Rusak M, Lassanova M, Ruscakova D (1979) <sup>14</sup>C-amino acid formation from labelled glucose and/or acetate in brain cortex slices with experimentally elicited proliferation of astroglia. Correlation of biochemical and morphological changes. *J Neurochem* 33: 1203-1215
- Whittaker VP (1968) The subcellular distribution of amino acids in brain and its relation to a possible transmitter function for these compounds. In: Structure and functions of inhibitory neuronal mechanisms. Pergamon Press, Oxford New York 1968. Proceedings of the 4th Int. Meeting of Neurobiologists, Stockholm, pp 487-504
- Wiechert P (1963) Über die Permeabilität der Blut-Liquor-Schranke für einige Aminosäuren. *Acta Biol Med Germ* 10: 305-310

Eingegangen am 12. Juli 1983