

**Verhaltenspharmakologische und
histologische Charakterisierung der
Funktion von Dopamin und Glutamat bei
der ‚nigralen‘ und ‚extranigralen‘
Pathologie in einem Tiermodell der
Parkinson-Krankheit**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

Vera Pedersen
aus Freiburg

2001

Tag der mündlichen Prüfung:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

3. Berichterstatter:

12. Januar 2001

Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

Prof. Dr. W.J. Schmidt

PD Dr. B.K. Müller

PD Dr. B. Ferger

meinen Eltern

Das ist ein großes Geheimnis. Für euch, die ihr den kleinen Prinzen auch liebt, wie für mich, kann nichts auf der Welt unberührt bleiben, wenn irgendwo, man weiß nicht wo, ein Schaf, das wir nicht kennen, eine Rose vielleicht gefressen hat oder vielleicht nicht gefressen hat...

*Schaut den Himmel an. Fragt euch: Hat das Schaf die Blume gefressen oder nicht? Ja oder nein?
Und ihr werdet sehen, wie sich alles verwandelt...*

Aber keiner von den großen Leuten wird jemals verstehen, daß das eine große Bedeutung hat!

(Antoine De Saint-Exupéry)

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Werner J. Schmidt für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes, für seine Betreuung und die Schaffung eines angenehmen Arbeitsklimas. Danken möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung Neuropharmakologie für die gute Arbeitsatmosphäre, besonders PD Dr. Beate Kretschmer und Dr. Thomas Tzschentke, mit denen ich ‚gross‘ geworden bin. Für die Lösung bürokratischer Probleme, technische Assistenz und Hilfe in der neurochemischen Analytik danke ich Daniela Binder, Daniela Hoffmann und Ulrich Ruess.

Bei Prof. Dr. Peter Riederer und Prof. Dr. Manfred Gerlach von der Abteilung für klinische Neurochemie der Universität Würzburg bedanke ich mich für die Überlassung des Arbeitsplatzes während meines Aufenthalts in Würzburg und ihre Kooperationsbereitschaft. Thomas Elpel von der Abteilung für klinische Neurochemie der Universität Würzburg danke ich für die Durchführung der Rezeptorbindungsstudien.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Förderung als Mitarbeiterin des Sonderforschungsbereichs „Zelluläre Mechanismen sensorischer Prozesse und neuronaler Interaktionen“ (Projekt: „Regionale Unterschiede zellulärer Vulnerabilität bei neurodegenerativen Erkrankungen“, SFB430, C8).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	10
1. Einleitung	13
1.1. Funktionelle Anatomie der Basalganglien	14
1.1.1. Parallel verlaufende funktionelle Schleifen der Basalganglien	14
1.1.2. Neurotransmitter in den Basalganglien	17
1.1.3. Prinzip der Transmitterbalance in den Basalganglien	19
1.2. Dopamin System	20
1.2.1. Dopaminerge Neurone und Projektionssysteme	20
1.2.2. Dopamin-Synthese und -Abbau	21
1.2.3. Dopamin-Rezeptoren	21
1.2.4. Verteilung und Lokalisation der Dopamin-Rezeptoren im mesostriatalen System	22
1.3. Glutamat System	23
1.3.1. Glutamaterge Projektionssysteme	23
1.3.2. Glutamat-Synthese und -Abbau	23
1.3.3. Glutamat-Rezeptoren	23
1.3.4. Verteilung und Lokalisation von NMDA-Rezeptoren und deren Untereinheiten	25
1.4. Pathophysiologie der Basalganglien bei der Parkinson-Krankheit	25
1.4.1. Dopamin-Substitution	26
1.4.2. Anti-Glutamaterge Therapie mit NMDA-Rezeptor Antagonisten	28
1.5. Neurodegenerative Prozesse der Parkinson-Krankheit	30
1.5.1. Das Konzept der langsamen, ‚energie-gebundenen Exzitotoxizität‘	31
1.5.2. Selektive Vulnerabilität bei der ‚nigralen‘ Pathologie	33
1.5.3. Form des Zelltods bei der ‚nigralen Pathologie‘	34
1.5.4. Modell der ‚retrograden transneuronalen Neurodegeneration‘	35
1.5.5. Genetische Faktoren	37
1.5.6. Sekundäre ‚extranigrale‘ Pathologie	38
1.6. Induzierbare Transkriptionsfaktoren	40
1.6.1. iTFs als anatomische Marker neuronaler Aktivierung	41
1.6.2. iTFs in Regeneration und Degeneration	42
1.6.3. iTF regulierte Zielgene	42
1.7. Tiermodelle der Parkinson-Krankheit	43
1.7.1. Neuroleptika induzierte Katalapsie	43
1.7.2. Reserpin Modell	43
1.7.3. MPTP-Modell	44
1.7.4. 6-Hydroxydopamin-Modell	45

2. Fragestellung	47
3. Material und Methoden	49
3.1. Versuchstiere und Haltung	49
3.2. Stereotaktische 6-OHDA Injektionen	49
3.3 Subkutane Implantation von miniosmotischen Pumpen	49
3.4. Substanzen	50
3.4.1. Dopamin D2-Rezeptor-Agonisten	50
3.4.2. Dopamin D2-Rezeptor-Antagonisten	50
3.4.3. NMDA-Rezeptor-Antagonist	50
3.5. Verhaltensexperimente	50
3.5.1. Katalepsie	50
3.5.2. Lokomotion	51
3.5.3. Schnüffelstereotypie	51
3.6. Neurochemie	51
3.6.1 Gewebepräparation	51
3.6.2. Probenaufarbeitung	52
3.6.3. HPLC-Analyse	52
3.6.4. Datenauswertung	53
3.7. Dopamin Rezeptor Bindungsassay	53
3.7.1. Probenaufarbeitung	53
3.7.2. Bindungsassay	53
3.7.3. Datenauswertung	53
3.8. Histologische Färbungen	54
3.8.1. Gewebspräparation und -fixierung	54
3.8.2. Gewebeaufarbeitung	54
3.8.3. Histochemische Färbungen	54
3.8.4. Immunhistochemie	55
3.8.5. TUNEL-Färbung	57
3.9. Mikroskopische Auswertung	58
3.9.1 Qualitative Bewertung der Immunreaktivität	59
3.9.2 Bestimmung der numerischen Dichte	61
3.9.3. Stereologie-basierte Abschätzung absoluter Zellzahlen	62
3.9.4. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	64
3.10. Statistik	64
4. Charakterisierung der chronischen neurodegenerativen Effekte einer bilateralen intrastriatalen 6-OHDA Injektionen	66
4.1. Einleitung	66
4.2. Versuchsdurchführung	68
4.3 Ergebnisse	68

4.3.1. Spontanverhalten	69
4.3.2. Wirkung von Haloperidol auf die Katalepsie	69
4.3.3. Neurochemie	69
4.3.4. Histologie	70
4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	84
4.5. Diskussion	86
5. Wirkung von Dopamin D2-Rezeptor-Agonisten auf die neurodegenerativen Effekte der 6-OHDA-Läsion	96
5.1. Einführung	96
5.2. Versuchsdurchführung	99
5.3 Ergebnisse	99
5.3.1. Spontanverhalten	100
5.3.2. Substanz-induziertes Verhalten	100
5.3.3. Apomorphin-induziertes Verhalten	101
5.3.4. Dopamin Rezeptor Bindungen	101
5.3.5. Neurochemie	101
5.3.6. Histologie	102
5.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	120
5.5. Diskussion	123
6. Wirkung eines NR2B-selektiven nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf die neurodegenerativen Effekte der 6-OHDA-Läsion	136
6.1. Einführung	136
6.2. Versuchsdurchführung	139
6.3 Ergebnisse	140
6.3.1. Spontanverhalten	140
6.3.2. Neurochemie	141
6.3.3. Histologie	142
6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	160
6.5. Diskussion	163
7. Allgemeine Diskussion und Schlussfolgerung	173
8. Literaturverzeichnis	177
Lebenslauf	202
Akademische Lehrer	203

Abkürzungsverzeichnis

5-HIAA	5-Hydroxyindolacetat
5-HT	5-Hydroxytryptamin
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
Acb	Nucleus accumbens
ACh	Acetylcholin
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
ANOVA	Varianzanalyse
AP	anterior-posterior
ASP	L-Aspartat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CaBP	Calcium-bindende Proteine
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CB	Calbindin D _{28K}
COMT	Katechol- <i>o</i> -methyltransferase
CPu	Nucleus caudatus/Putamen
DA	Dopamin
DAT	Dopamin Transporter
DHBA	Dihydroxybenzylamin
DID	Dopaminomimetika-induzierte Dyskinesie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylacetat
FRA	Fos related antigen
GABA	γ -Aminobuttersäure
GLU	L-Glutamat
h	Stunde
HVA	Homovanillinsäure
IF	Immunfluoreszenz
IR	Immunreaktivität
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
LGP	Globus pallidus pars lateralis
LID	L-DOPA-induzierte Dyskinesie
MAO	Monoaminoxidase
MFB	mediales Vorderhirnbündel
MGP	Globus pallidus pars medialis
min	Minute
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridinium-Ion
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
N	Anzahl
NA	Noradrenalin
NMDA	N-methyl-D-aspartat
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PFC	Cortex prefrontalis
PPTg	Nucleus tegmentalis pedunculopontinus
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
sek	Sekunde
SNC	Substantia nigra pars compacta
SNR	Substantia nigra pars reticulata
STN	Nucleus subthalamicus

TBS	Tris-gepufferte Saline
TUNEL	Terminale-deoxynucleotidyl-Transferase vermittelte Desoxyuridin-triphosphat Einzelstrangbruch Markierung
üN	über Nacht
VP	Pallidum ventrale
ZNS	zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde im Tiermodell die Rolle des dopamin (DA)ergen und glutamat (GLU)ergen Systems bei den neurodegenerativen Prozessen, die der Parkinson-Krankheit zugrundeliegen, untersucht. Die Versuche wurden mit verhaltenspharmakologischen Methoden an der Ratte durchgeführt und durch neurochemische, biochemische und histologische Techniken ergänzt.

Es wurde ein Tiermodell weiterentwickelt, mit dem das frühe klinische Stadium der Parkinson-Krankheit erfasst werden kann. Das Modell weist durch seine vergleichbaren Verhaltensveränderungen sowie den spezifischen Degenerationsmustern und Veränderungen der Neurotransmittersysteme eine hohe Validität auf und ermöglicht die Untersuchung von selektiven Eingriffen in das DAerge und GLUerge Transmittersystem und deren Auswirkung auf die degenerativen Prozesse. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche unterstützen die Eignung dieses Tiermodells zur präklinischen Untersuchung neuer Therapiestrategien für die Parkinson-Krankheit.

Eine bilaterale intrastriatiale Injektion des Neurotoxins 6-Hydroxydopamin verursachte in dem untersuchten Zeitraum von 4 – 8 Wochen eine selektive retrograde Degeneration DAerger Neurone im ventralen Mesencephalon, mit grösster Präferenz für die Substantia nigra pars compacta (SNC) und einen korrespondierenden partiellen Verlust der DAergen Innervation des Striatums. Die striatonigrale Degeneration induzierte Verhaltensdefizite wie eine Störung der Bewegungsinitiation (Akinese) und eine Abnahme der spontanen lokomotorischen und explorativen Aktivität in den Versuchstieren, die über den Beobachtungszeitraum von 8 Wochen progredient waren. Die degenerationsbedingten Verhaltensstörungen zeigen wesentliche Übereinstimmungen mit den motorischen Symptomen der Parkinson-Krankheit, der Verlust der DAergen Neurone in der SNC und das Ausmass der DA-Denervation stimmt mit der frühen klinischen Neuropathologie der Erkrankung überein. Die partielle striatonigrale DAerge Degeneration induzierte neben dieser spezifischen ‚nigralen‘ Pathologie anhaltende Veränderungen neuronaler Aktivitäten und Funktionen in distalen Gehirnregionen, die auch bei der Parkinson-Krankheit im chronischen Verlauf veränderte Funktionen aufweisen und mitunter selektiv degenerieren. Es wird postuliert, dass eine weitreichende Veränderung der Neurotransmitterbalancen nach DA-Denervation, in Form einer primären DA-Hypofunktion und einer sekundären GLU-Hyperfunktion, zur Entwicklung dieser ‚extranigralen‘ Pathologie in den Ein- und Ausgangskerne der Basalganglien sowie eng assoziierten kortikalen und subkortikalen Strukturen beiträgt. Daraus kann abgeleitet werden, dass eine Wiederherstellung des DA-Tonus oder eine Inhibition der GLU-Überaktivität nicht nur zur Verminderung der Parkinson-Symptome beiträgt, sondern auch eine Verzögerung der zugrundeliegenden degenerativen Prozesse ermöglichen kann.

In dem hier eingesetzten Modell der langsamen striatonigralen Degeneration konnte die Wiederherstellung des DA-Tonus mit dem langwirksamen DA D2-Rezeptor-Agonisten Cabergolin die Progression der SNC Degeneration zwar verzögern, jedoch keine funktionell effiziente Neuroprotektion bewirken. Dies macht deutlich, dass die ‚nigrale‘ Pathologie zwar durch eine DA-Hypofunktion und wahrscheinliche sekundäre GLU-Hyperfunktion

beeinflusst wird, jedoch weitere Faktoren wie z.B. energetische Defizite oder ein Verlust von Wachstumsfaktoren zur Degeneration beitragen.

In Folge der chronische Behandlung mit Cabergolin wurde gezeigt, dass eine kontinuierliche Wiederherstellung des DA-Tonus zu einem frühen Zeitpunkt der striatonigralen Degeneration die veränderten neuronalen Funktionen im Striatum und den Ausgangskernen der Basalganglien normalisiert, also in den Regionen, in denen nach der Vorhersage eine Imbalance zwischen der DAergen und GLUergen Transmission herrscht. Diese Wirkung wurde durch die chronische pulsatile Stimulation mit dem kurzwirksamen DA-Rezeptor-Agonisten Lisurid nicht erreicht. Die Verhaltensuntersuchungen zeigten, dass die pulsatile DA-Rezeptorstimulation eine Sensitivierung der motorischen Verhaltensantwort auslöst, was dahingehend interpretiert werden kann, dass das pharmakokinetische Profil eines DA-Rezeptor-Agonisten über dessen Potential entscheidet, motorische Komplikationen wie Dyskinesien auszulösen. Zusammen unterstützen diese Befunde die aktuelle Diskussion darüber, dass die frühe DA-Substitution mit einem langwirksamen DA-Rezeptor-Agonisten einen physiologischen DA-Tonus wiederherstellt und somit die pathologischen neuroadaptativen Prozesse, insbesondere des striatofugalen Projektionssystems, auf denen die Entwicklung motorischer Komplikationen bei Parkinson Patienten wahrscheinlich basiert, verhindern kann.

Eine ‚aktivitäts-abhängige‘ Inhibition der postulierten GLU-Hyperaktivität mit dem N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptor-Antagonist CP-101,606, der selektiv an die Polyaminbindungsstelle der NMDA-Rezeptor 2B (NR2B) Untereinheit bindet, zeigte entgegen der Hypothese weder antiparkinsonoide Wirkung noch ein neuroprotektives Potential hinsichtlich der ‚nigralen‘ Pathologie. Damit ist der Vorstellung, dass die sekundäre GLU-Hyperaktivität sowohl zur Ausprägung der motorischen Symptome als auch zur Progression der Degeneration beiträgt nicht grundsätzlich widersprochen. Basierend auf der Zusammensetzung der NMDA-Rezeptoren und deren Verteilung in den Kernen der Basalganglien machen diese Befunde vielmehr deutlich, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, die die NR2B Untereinheit enthalten, wenig Anteil an der Vermittlung dieser pathologischen Veränderungen hat. Weiterhin wird hier die Möglichkeit aufgezeigt, dass auch das GLUerge Transmittersystem, insbesondere im Striatum, adaptativen Prozessen in Folge der DA-Denervation unterliegt, was durch aktuelle Studien belegt wird. Dies schränkt den Einsatz dieser Substanzklasse der NMDA-Rezeptor-Antagonisten zur unmittelbaren Symptombehandlung bei der Parkinson-Krankheit zunächst ein. Da jedoch die Behandlung mit CP-101,606 regionspezifisch differenzielle Effekte auf die neuronalen Funktionen in den Kernen der Basalganglien sowie assoziierter Strukturen zeigte, lässt sich die Annahme, dass eine ‚aktivitäts-abhängige‘ Inhibition der sekundären GLU-Hyperaktivität die Entstehung der ‚extranigralen‘ Pathologie verzögert, weiterhin stützen. In Anlehnung an die aktuelle Diskussion über den Einsatz von GLU-Antagonisten zur Behandlung von Dykinesien, zeigte die Wirkung von CP-101,606 auf die Aktivität striataler Neurone, dass diese Form der anti-GLUergen Therapie potentiell Eignung bei Parkinson Patienten finden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Degeneration der DAergen Neurotransmission entscheidend zur Progression der ‚nigralen‘ und ‚extranigralen‘ Pathologie bei der Parkinson-Krankheit beitragen kann. Pathologische neuroadaptive Mechanismen des

kompromitierten DAergen Systems sind ebenfalls für die motorischen Komplikationen, die mit der DA-Substitutionstherapie verbunden sind, verantwortlich. Die Rolle der GLUergen Neurotransmission in diesen Prozessen kann in vorliegender Arbeit nicht eindeutig charakterisiert werden, eine GLUerge Einflussnahme kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. Die möglichst physiologische Wiederherstellung des DA-Tonus im zentralen Nervensystem stellt daher nach wie vor die adäquateste Pharmakotherapie der Parkinson-Krankheit dar.

1. Einleitung

Die Parkinson-Krankheit, aus medizinischer Sicht zuerst von James Parkinson 1817 beschrieben (*An Essay on the shaking Palsy*), ist eine der bedeutendsten degenerativen Erkrankungen des alternden zentralen Nervensystems. Die Erkrankung äussert sich in den drei Kardinalsymptomen Muskelrigor, Ruhetremor und Brady- bzw. Akinese. Das klinische Bild umfasst jedoch auch Gang- und Haltungsstörungen und nicht-motorische Veränderungen wie Demenzen, depressive Verstimmungen, autonome und sensorische Abnormalitäten.

Neuropathologisch ist die idiopathische Parkinson-Krankheit durch eine progressive Degeneration der pigmentierten dopaminergen Neurone, präferenziell in der Substantia nigra pars compacta charakterisiert, verbunden mit dem Auftreten intrazellulärer Proteinaggregationen, die zuerst von Lewy 1912 als Lewy Körper beschrieben wurden. Der Verlust dopaminerges Mittelhirnneuron hat einen Dopamin-Mangel insbesondere im Striatum zur Folge, das wiederum vornehmlich für die Ausprägung der charakteristischen Symptome verantwortlich ist. Klinisch wird die Erkrankung auffällig wenn der Verlust dopaminerges Neurone 40 – 60 % beträgt, die Neurodegeneration schreitet jedoch im Verlaufe der Krankheit weiter voran, entsprechend ist die Progredienz der Symptomausprägung. Neben dieser primären ‚nigralen‘ Pathologie werden sekundäre (‚extranigrale‘) neurodegenerative Veränderungen im dopaminergen ventralen Tegmentum, im noradrenergen Locus coeruleus, im cholinergen Nucleus basalis Meynert und Nucleus tegmentalis pedunculo-pontinus, in den serotonergen Kernen des Raphe-Komplex sowie in verschiedenen Regionen des zerebralen Kortex beobachtet. Demnach ist die Parkinson-Krankheit primär eine Erkrankung des Dopamin-Systems, sekundär erfahren jedoch nahezu alle Transmittersysteme degenerative Veränderungen.

Aufgrund des zunehmenden Verlustes der dopaminergen Innervation im Striatum kommt es nicht nur hier zu Störungen in der Informationsverarbeitung. In den Kernen der Basalganglien kommt es zu einer umfassenden Veränderung der Transmitterbalancen, die zunächst die korrekte Prozessierung kortikaler Information und Umsetzung in motorische und kognitive Funktionen beeinträchtigt. Pathologisch veränderte Transmitteraktivitäten sind wahrscheinlich an der voranschreitende Degeneration der Substantia nigra beteiligt und vermutlich auch an der Entstehung und Ausprägung ‚extranigralen‘ Pathologie.

Diese Arbeit soll mit verhaltenspharmakologischen, neurochemischen, biochemischen und histologischen Methoden zeigen, in welcher Weise die Neurotransmitter Dopamin und Glutamat an der Degeneration der Substantia nigra pars compacta und an der Entstehung der ‚extranigralen‘ Pathologie bei der Ratte beteiligt sind. Dazu werden zunächst Verhaltensveränderungen, die für die Parkinson-Krankheit relevant sind, sowie die ‚nigrale‘ Degeneration und die ‚extranigralen‘ Funktionsveränderungen in einem Degenerationsmodell charakterisiert, das einem frühen klinischen Stadium der Parkinson-Krankheit entspricht. Durch einen anhaltenden systemischen Eingriff in die Dopamin- oder Glutamat-Transmission über mehrere Wochen, was mit einer chronischen Behandlung bei der Parkinson-Krankheit vergleichbar ist, sollen die Transmitterbalancen selektiv wiederhergestellt werden und deren Einfluss auf die zuvor charakterisierten funktionellen und neurodegenerativen Veränderungen beurteilt werden.

1.1. Funktionelle Anatomie der Basalganglien

Unter dem Begriff Basalganglien wird eine Gruppe miteinander verbundener subkortikaler Kerngebiete, die im Telencephalon, Diencephalon und Mesencephalon liegen, zusammengefasst. Die Spekulationen über deren Funktionen werden sehr stark durch die klinische Phänomenologie der Basalganglien-Erkrankungen beim Menschen, wie der Parkinson-Krankheit, beeinflusst (Albin et al., 1989). Heute weiss man, dass die Basalganglien nicht nur einfache motorische Muster generieren, sondern dass sie auch die Generierung von komplexem Verhalten sowie kognitive Verhaltenssteuerung und Gewohnheitslernen vermitteln (siehe Schmidt, 2000).

Die Haupteingangsstruktur der Basalganglien ist das telencephale Striatum, das wiederum aus einem dorsalen und einem ventralen Teil besteht. Beim Primaten wird das dorsale Striatum aus zwei funktionell und anatomisch unterscheidbaren Strukturen gebildet, dem Nucleus caudatus und dem Putamen, beim Nagetier bildet es eine einheitliche Struktur, das Nucleus caudatus/Putamen (CPu). Als ventrales Striatum wird der Nucleus accumbens (Acb) und das Tuberkulum olfactorium zusammengefasst. Die primären Ausgangstrukturen der Basalganglien sind die mesencephale Substantia nigra pars reticulata (SNR), der Globus pallidus pars medialis (MGP; homolog dazu in der Ratte der Nucleus entopeduncularis, EP) und das Pallidum ventrale (VP) im Diencephalon. Weiterhin werden im Diencephalon der Globus pallidus pars lateralis (LGP), der Nucleus subthalamicus (STN) und im Mesencephalon die Substantia nigra pars compacta (SNC) und der Area tegmentalis ventralis (VTA) zu den Basalganglien gezählt (Zusammenfassungen in Albin et al., 1989; Alheid und Heimer, 1988).

1.1.1. Parallel verlaufende funktionelle Schleifen der Basalganglien

Generell stellen die Basalganglien die Verbindung von kortikalen Arealen über den Thalamus in Form von kortiko-thalamo-kortikalen Projektionsschleifen her. Hierbei erhält das Striatum exzitatorische Afferenzen aus nahezu allen Bereichen des Kortex und dem Thalamus, beide Projektionen benutzen Glutamat (GLU) als Transmitter. Die kortikostriatalen Projektionen erfolgen topographisch geordnet unter Beibehaltung der anterior-posterioren bzw. medio-lateralen Verhältnisse, was die Basis für funktionell getrennte Schaltkreise darstellt (Alexander et al., 1986). Im Primaten werden derzeit fünf funktionelle Schaltkreise unterschieden. Die Somatotopie impliziert zwar einen gewissen Grad an Segregation dieser Schaltkreise, erwiesene Konvergenzen und Divergenzen bieten jedoch zusätzlich ein anatomisches Netzwerk zur Integration und Transformation kortikaler Informationen (Graybiel et al., 1994). Im folgenden sollen die Projektionssysteme der Schleifen skizziert werden, die für die Pathophysiologie der Parkinson-Krankheit von besonderer Bedeutung sind.

Dorsostriatale Schleifen

Zwei funktionelle Schleifen, die beim Primaten und auch bei der Ratte an der Prozessierung motorischer und kognitiver Information wesentlich beteiligt sind, sind die motorische bzw. die dorsolaterale präfrontale Schleife, die ihren Eingang im dorsalen Striatum finden (Abb. 1)(Alexander et al., 1986; Hauber, 1992). Die striatofugale Projektion erfolgt entweder direkt auf die Ausgangskerne MGP und SNR oder indirekt, über den LGP und den STN auf die

Ausgangsstrukturen. Diese wiederum sind über thalamische Kerne mit den kortikalen Regionen verbunden. Sowohl der STN als auch MGP/SNR projizieren (Abb. 1) reziprok in die mesencephale lokomotorische Region (MLR), bestehend aus dem Nucleus tegmentalis pedunculopontinus (PPTg) und weiteren Hirnstammkernen (Brudzynski et al., 1988; Milner und Mogenson, 1988, Zusammenfassung in Inglis und Winn, 1995). Die absteigenden Projektionen des PPTg innervieren Kerne in der Pons, der Medulla, der retikulären Formation sowie tiefe zerebelläre Kerne und das Rückenmark. Neben der aufsteigenden Verbindung in den STN und MGP/SNR projizieren die Neurone des PPTg hauptsächlich in den Thalamus. Generell sind die auf- und absteigenden Projektionen des PPTg im Primaten und im Nagetier ähnlich (Abb.1) (Zusammenfassung in Inglis und Winn, 1995; Pahapill und Lozano, 2000). Die somatotopischen Afferenzen dieser beiden Schleifen aus prämotorischen, motorischen, supplementärmotorischen und präfrontalen Kortexregionen innervieren beim Primaten das Putamen bzw. den dorsolateralen Nucleus caudatus, bei der Ratte sind es entsprechend Afferenzen aus dem sensomotorischen und präfrontalen Kortex (PFC), die das dorsolaterale bzw. dorsomediale CPU innervieren. Die thalamokortikale Projektionen zum prämotorischen und motorischen Kortex erfolgen über den Nucleus ventrolateralis (VL) bzw. ventroanterior (VA) thalami und den Nucleus mediodorsalis thalami (MD), bei der Ratte entsprechend über den Nucleus ventromedialis thalami (VM) (Graybiel, 1990; McGeorge und Faull, 1989; Sesack et al., 1989; Takada et al., 2000).

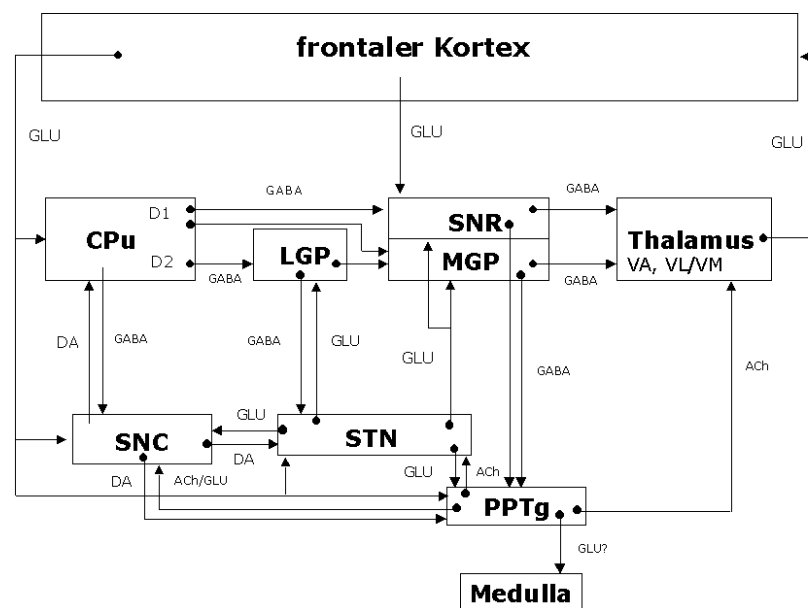


Abb. 1: Schematische Darstellung der Verbindungen und der Neurotransmitter der dorsalen Basalganglien Schleife. CPU, Nucleus caudatus/Putamen; LGP, Globus pallidus pars lateralis; MGP, Globus pallidus pars medialis; PPTg, Nucleus tegmentalis pedunculopontinus; SNC, Substantia nigra pars compacta; SNR, Substantia nigra pars reticulata; STN, Nucleus subthalamicus; VA/VL/VM, Nucleus ventroanterior/ventrolateralis/ventromedialis thalami; ACh, Acetylcholin; DA, Dopamin; GABA, γ -Aminobuttersäure; GLU, Glutamat; (nach Schmidt et al., 1992, ergänzt nach Inglis und Winn, 1995).

Ventrostriatale Schleife

Die ventrostriatale Schleife ist aufgrund ihrer engen Verbindungen mit Strukturen des limbischen Systems nicht nur in die Prozessierung motorischer Information sondern

vielmehr in motivational und emotional gesteuertes motorisches Verhalten involviert. Das ventrale Striatum wird vom PFC sowie limbischen und olfaktorischen Kortexregionen, der Amygdala und dem Hippokampus innerviert (Heimer et al., 1982). Neben den Ausgangsstrukturen der dorsostriatalen Schleife projiziert das ventrale Striatum hauptsächlich in das VP, das wiederum über den Nucleus mediodorsalis thalami (MD) limbische Kortexregionen erreicht (Abb. 2) (Alheid und Heimer, 1988). In Analogie zur dorsostriatalen Schleife innerviert das VP die MLR reziprok (Milner und Mogenson, 1988).

„Extended Amygdala“

Neben diesen striatopallidalen Projektionssystemen bildet das Kontinuum der *„extended Amygdala“* (EA) einen weiteren, zunächst eigenständigen parallelen kortikofugalen Projektionsweg im basalen Vorderhirn, der aber insbesondere mit der ventrostriatalen Schleife der Basalganglien in enger Verbindung steht (Abb. 2) (Zusammenfassungen in Alheid et al., 1995; Alheid und Heimer, 1988). Basierend auf morphologischen und neuroanatomischen Grundlagen wird der EA Komplex beim Primaten und bei der Ratte in eine mediale amygdaloide Gruppe (MeA), bestehend aus dem medialen Anteil des Nucleus interstitialis striae terminalis (BSTM) und dem Corpus amygdaloideum nucleus medialis (Me), sowie eine zentrale amygdaloide Gruppe (CeA), aus dem lateralen Anteil des Nucleus interstitialis striae terminalis (BSTL) und dem Corpus amygdaloideum nucleus centralis (Ce), unterschieden. Die MeA und CeA bilden jeweils ein Kontinuum, in dem die Information aus dem rostral gelegenen BST über sublentikuläre Regionen (u.a. Substantia innominata) nach kaudal in die Amygdala und reziprok prozessiert wird. In Analogie zu den striatopallidalen Systemen, erhält der laterale Anteil der CeA Afferenzen aus frontalen und limbischen Kortexregionen und beeinflusst diese wiederum über die magnozellularen kortikopetalen Vorderhirnkerne (u.a. Nuclei septi medialis, Substantia innominata). Über die mediale CeA führen absteigende Projektionen zum Thalamus, Hypothalamus, Hirnstamm und Rückenmark. Aufgrund ihrer vielfältigen Verbindungen hat die EA demnach Einfluss auf neuroendokrine, somatomotorische und autonome Funktionen sowie vielfältige kortikal-gesteuerte kognitive Funktionen (Zusammenfassungen in Alheid et al., 1995; Alheid und Heimer, 1988). Eine enge anatomische Verbindung des EA Komplex mit den striatopallidalen Vorderhirnsystemen wird wahrscheinlich über den medialen Teil des Acb hergestellt (Abb. 2) (Alheid und Heimer, 1988), die wahrscheinlich auch funktionell in einer *„feed forward“* Prozessierung innerhalb dieser anatomischen Systeme resultiert (Zahm, 2000).

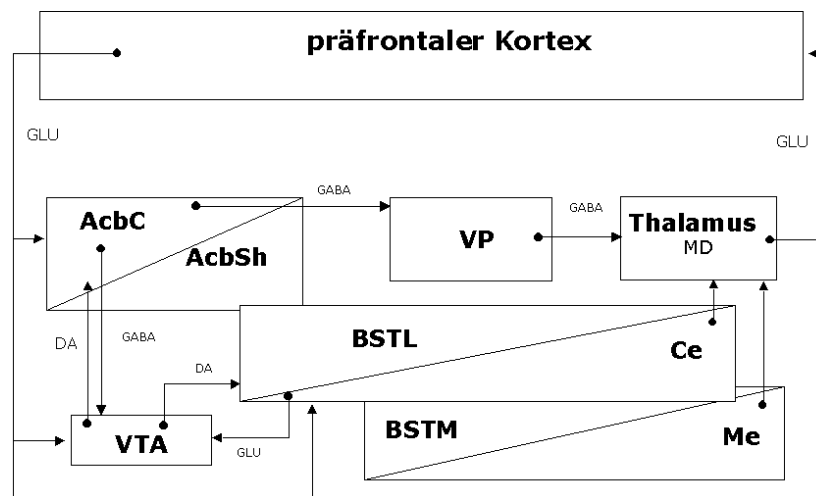


Abb. 2: Schematische, stark vereinfachte, Darstellung der Verbindungen und Neurotransmitter in der ventralen Basalganglien Schleife und deren Verbindung zur 'extended Amygdala'. AcCbC, Nucleus accumbens core Region; AcCbSh, Nucleus accumbens shell region; BSTL/M, Nucleus interstitialis striae terminalis laterale/medialis Division; Ce/Me, Corpus amygdaloideum nucleus centralis/medialis, MD; Nucleus mediodorsalis thalami; VP, Pallidum ventrale; DA, Dopamin; GABA, γ -Aminobuttersäure; GLU, Glutamat; (nach Alheid et al., 1995; Alheid und Heimer, 1988).

1.1.2. Neurotransmitter in den Basalganglien

Der Neurotransmitter der kortikalen Afferenzen in die Eingangsstrukturen der Basalganglien ist GLU, ebenso sind die thalamokortikalen Projektionen GLUerg erregend. Neben dem exzitatorischen Eingang erhalten das dorsale und ventrale Striatum eine dopamin (DA)erge Innervation aus dem ventralen Mesencephalon von der SNC und dem VTA. Weiterhin erhält das Striatum serotonerge (5-HT) Innervation aus dem Nucleus raphe dorsalis und noradrenerge (NA) Innervation aus dem Locus coeruleus (siehe Aston-Jones et al., 1995; Halliday et al., 1995)). Die striatalen Projektionsneurone sowie die Projektionsneurone des LGP benutzen den hemmenden Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und wirken somit inhibitorisch auf ihre jeweiligen Zielregionen. Ebenso hemmend ist die Wirkung der Ausgangsstrukturen MGP/SNR und VP auf die jeweiligen thalamischen Kerne (Albin et al., 1989). Der STN ist der einzige GLUerge Kern der Basalganglien über den zum einen die Ausgangsstrukturen erregt werden (Abb. 1)(Smith und Parent, 1988), aber auch der PPTg eine exzitatorische Innervation erhält (Zusammenfassung in Inglis und Winn, 1995). Der PPTg selbst ist beim Primaten und im Nagetier eine sehr heterogene Struktur, mit cholinergen und GLUergen Projektionsneuronen, über die der Thalamus, der STN und die Ausgangsstrukturen und auch die retikuläre Formation erregt werden, wobei derzeit nicht endgültig geklärt ist, welcher Transmitter jeweils benutzt wird, eine Kotransmission wird ebenfalls nicht ausgeschlossen (Zusammenfassungen in Inglis und Winn, 1995; Pahapill und Lozano, 2000) (Abb. 1).

Neurone und Transmitter im Striatum

Golgi-Färbungen und neuroanatomische Untersuchungen lassen drei morphologische differenzierbare Neuronentypen im dorsalen Striatum erkennen, die sich in der Grösse ihrer Somata sowie dem Vorhandensein von dendritischen Spines unterscheiden. Die grösste Population mit 95 % der striatalen Neurone machen die ‚medium spiny neurons‘ (MSN) aus, Projektionsneurone mit grossen Dendritenbäumen, die die Innervation zu den Ausgangsstrukturen herstellen (Wilson und Groves, 1980). Neben GABA als klassischem Neurotransmitter kolokalisieren die Neuropeptide Enkephalin (ENK) oder Substanz P (SP)/Dynorphin (DYN) in den MSN (Beckstead und Kersey, 1985). Aus dieser Kolokalisation lassen sich zwei Populationen von MSN Projektionsneuronen definieren: (i) striatonigrale GABAerge MSN der ‚direkten‘ Bahn, die SP/DYN als Kotransmitter benutzen und (ii) striatopallidale GABAerge MSN der ‚indirekten‘ Bahn, mit ENK als Kotransmitter (Albin et al., 1989). Die übrigen 5 % der striatalen Neurone bestehen aus mittelgrossen bis grossen ‚spiny‘ Interneuronen, die entweder Acetylcholin (ACh) (1-2 % der striatalen Neurone), Somatostatin, NADPH-Diaphorase oder GABA zusammen mit Parvalbumin oder Calretinin enthalten (siehe Kawaguchi et al., 1995). Die Interneurone verfügen über ein extensive Axonkollaterales-Netzwerk innerhalb des Striatums, mit dem sie die MSN innervieren. Darüberhinaus wurden unlängst intrinsische ‚spiny‘ und ‚aspiny‘ DAerge Neurone im Striatum von Affen und Ratten nachgewiesen (Betarbet et al., 1997).

Die GLUergen Projektionen aus dem Kortex sowie die DAergen Afferenzen aus dem Mesencephalon terminieren gemeinsam auf den distalen Dendriten der MSN. Hierbei bilden kortikostriatale Neurone assymetrische Synapsen an den Köpfen der ‚spines‘, die mesostriatalen Neurone dagegen stellen über symmetrische Synapsen am Schaft der ‚spines‘ synaptischen Kontakt her (Abb. 3). Striatale Interneurone bilden Synapsen im somatischen Bereich bzw. im Bereich proximaler Dendriten aus (Zusammenfassung in Smith und Bolam, 1990).

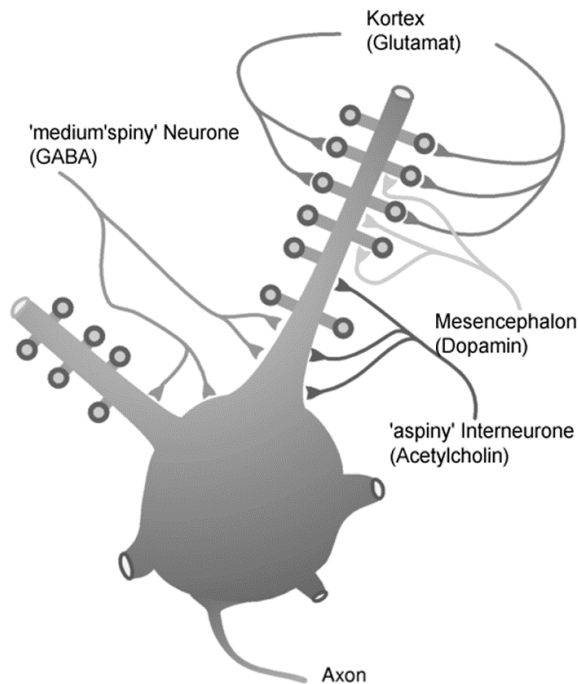


Abb. 3: Darstellung der Termination striataler Afferenzen auf 'medium spiny' Projektionsneuronen. Kortikostriatale glutamaterge und mesostriatale dopaminerge Projektionen terminieren an den 'Spines' im distalen Bereich der Dendriten. Intrastriatale Projektionen der cholinergen Interneuronen und GABAerger Projektionsneurone stellen synaptische Kontakt im somatischen und proximalen dendritischen Bereich her (adaptiert nach Smith und Bolam, 1990, aus Mink, 1999).

1.1.3. Prinzip der Transmitterbalance in den Basalganglien

Basierend auf diesen neuroanatomischen Verhältnissen lässt sich für das Funktionsmodell der Basalganglien erkennen, dass deren Funktion, die in der Generierung und Bewertung kontext-angepasster Verhaltensmuster besteht, eine eng abgestimmte Balance der beteiligten Transmittersysteme erfordert. Auf der Ebene des dorsalen Striatums bedeutet dies einen modulierenden Einfluss mesostriataler, phasisch aktiver DAerger Projektionen auf die exzitatorische tonische Kontrolle kortikostriataler GLUerger Neurone über die Aktivität der MSN. Ähnlich liegt in den Ausgangsstrukturen der Basalganglien eine Balance vor zwischen einem hemmenden GABAergen Einfluss durch die striatofugale Projektion und einer erregenden GLUergen Kontrolle aus dem STN, über die wiederum die Aktivität der nachgeschalteten thalamokortikalen ascendierenden Projektionen gesteuert wird.

Selektive Degenerationen eines dieser Transmittersysteme, wie sie der Parkinson-Krankheit zugrunde liegen, führt zu einer Verschiebung der Transmitterbalancen und somit zu einer weitreichenden Veränderung neuronaler Aktivitäten in den Kernen der Basalganglien, die in Folge die komplexen Verhaltensstörungen der Erkrankung bedingen.

Da das ventrale Striatum embryologische, zytologische, histochemische und hodologische Gemeinsamkeit mit dem dorsalen Striatum aufweist, und es somit wahrscheinlich eine ventrale Ausdehnung des Striatums darstellt (Alheid und Heimer, 1988) ist zu vermuten, dass auch hier ähnliche Transmitterinteraktionen und -balancen vorliegen, die zur funktionellen Prozessierung der neuronalen Information nötig sind. Parallel dazu, implizieren gleiche Neuronentypen, Neurotransmitter und Verschaltungsmuster des EA Komplex (Alheid und Heimer, 1988), dass auch in diesem Vorderhirnprojektionssystem eine

wohlabgestimmte Balance afferenter und efferenter Projektionen dessen Funktion in kortikalen Prozessen und in Prozessen der striatopallidalen Projektionssysteme gewährleistet.

1.2. Dopamin System

1.2.1. Dopaminerge Neurone und Projektionssysteme

Neurone, die Katecholamine enthalten, finden sich im Hirnstamm, von der Medulla oblongata bis zum Diencephalon, im Bulbus olfactorius und in der Retina. Davon findet sich die grösste Ansammlung DAerger Neurone im ventralen Mesencephalon in der nigralen Zellgruppe A9 (SNC) und den nicht-nigralen Neuronen der Zellgruppen A8 (Nucleus retrorubralis) und A10 (VTA), die den Ursprung des mesotelencephalen DA-Projektionssystems bilden. Die telencephale Projektion verläuft innerhalb des medialen Vorderhirnbündels (MFB) und erreicht dort das dorsale und ventrale Striatum (mesostriatales System) sowie limbische und kortikale Regionen (mesolimbokortikales System) wie das Septum, die Amygdala, den PFC und weitere limbische Kortexregionen (Abb. 4). Diese Projektionen erfolgen sowohl nach einer medio-lateralen als auch antero-posterioren Topographie geordnet. Die ventralen Zellgruppen A9 und A10 innervieren die dorsal gelegenen Strukturen wie das Striatum, die dorsalere Zellgruppe A8 dagegen innerviert eher die ventral gelegenen Zielregionen wie das olfaktorische Tuberkulum und die Amygdala (Zusammenfassung in Björklund und Lindvall, 1984). Bereits frühe aber auch neuere Arbeiten mit Mehrfachmarkierungen und -färbungen, zeigen, dass die Kollateralisation ein wichtiges Organisationsprinzip des mesotelencephale System darstellt (Björklund und Lindvall, 1984; Cossette et al., 1999; Gauthier et al., 1999). Weiterhin bestehen zu einem nicht unerheblichen Anteil kontralaterale Projektionen aus der SNC und dem VTA in die jeweiligen Vorderhirnregionen (siehe Björklund und Lindvall, 1984).

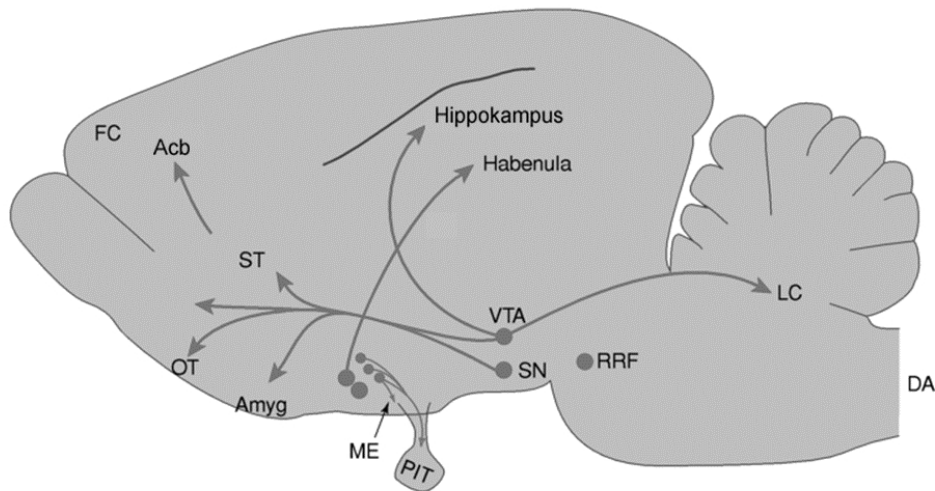


Abb. 4: Schematisierte Illustration der wichtigsten dopaminergen Neuronengruppen und deren Projektionsgebiete. Acb, Nucleus accumbens; Amyg, Amygdala; FC, Kortex frontalis; LC, Locus coeruleus; ME, mediale Eminenz; OT, Tractus opticus; PIT, Hypophyse; RRF, Area retrorubralis; SN, Substantia nigra; ST, Striatum; VTA, Area tegmentalis ventralis (aus Deutch und Roth, 1999).

1.2.2. Dopamin-Synthese und -Abbau

Die Biosynthese des Neurotransmitters DA geht von der aromatischen Aminosäure L-Tyrosin aus, die intraneuronal durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) zu Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) hydroxyliert wird und anschliessend durch die L-Aromatische Aminosäure Decarboxylase (L-AADC) zu DA decarboxyliert wird. In DAergen Neuronen wird der synthetisierte Transmitter über einen vesikulären Monoamin-Transporter in den Speichervesikeln akkumuliert. Die Freisetzung von DA erfolgt über eine Ca^{2+} -abhängige Exozytose an symmetrischen Synapsen der Axonterminalen aber auch an sogenannten *en passant* Synapsen entlang des axonalen Fortsatzes. Weiterhin kann DA somatodendritisch, möglicherweise durch nicht-konventionelle Exozytose, und durch Umkehr der DA-Transporter freigesetzt werden. Die Inaktivierung des freigesetzten DA erfolgt hauptsächlich durch die Wiederaufnahme in die Präsynapse über den plasmamembranständigen hochaffinen DA-Transporter (DAT), wo es entweder wieder in Speichervesikel aufgenommen wird, oder durch degradierende Enzyme wie die Monoaminoxidase (MAO, Isoformen A und B) oder die Katechol-*o*-methyltransferase (COMT) oxidativ abgebaut wird (Zusammenfassung in Deutch und Roth, 1999). Die TH-Reaktion stellt unter basalen Bedingungen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der DA-Synthese dar. Eine Regulation der DA-Synthese kann demnach durch die Veränderung der TH-Enzymaktivität z.B. durch Phosphorylierung erfolgen, oder aber durch translationale und transkriptionale Kontrolle der TH Expression (Zusammenfassung in (Kumer und Vrana, 1996). Weiterhin wird sowohl die DA-Synthese als auch die DA-Freisetzung durch DA-Autorezeptoren gesteuert (siehe 1.2.3.).

1.2.3. Dopamin-Rezeptoren

Die DA-Rezeptoren zählen zu den metabotropen Membranrezeptoren und wurden ursprünglich aufgrund ihrer Ligandenselektivität und ihrer positiven (D1) bzw. negativen (D2) Kopplung über G-Proteine (Guanosin-bindendes Protein) an die Adenylyl-Cyclase Signalkaskade charakterisiert (Kebabian und Calne, 1979). Molekulare Klonierungen zeigten

die Existenz von 5 (D1-D5) DA-Rezeptor-Subtypen, wobei die D1- und D5-Rezeptoren pharmakologisch der D1-Rezeptorfamilie, die D2-, D3-, D4-Rezeptoren der D2-Rezeptorfamilie zugeordnet werden (Zusammenfassung in Sealfon und Olanow, 2000). Funktionell resultiert die Aktivierung der D1-Rezeptoren in einer Erhöhung der intrazellulären zyklischen Adenosin-5'-monophosphat (cAMP)-Konzentration und einer entsprechenden Aktivierung nachgeschalteter zellulärer Prozesse; hingegen bewirkt die Stimulation von D2-Rezeptoren eine Reduktion der cAMP-Konzentration und entsprechend eine Inhibition nachgeschalteter Signalkaskaden. Das Gen für den D2-Rezeptor kodiert für zwei Isoformen des Rezeptors, einer langen (D2L) und einer kurzen (D2S), die durch alternatives ‚Splicing‘ entstehen und aufgrund dessen sie sich in ihrer Kopplungseigenschaft an das G-Protein unterscheiden (Guiramand et al., 1995; Montmayeur et al., 1993). Unlängst wurde gezeigt, dass die D2L Isoform hauptsächlich postsynaptisch aktiv ist, während die D2S Isoform präsynaptische Autorezeptorfunktion besitzt (Usiello et al., 2000). Funktionell voneinander unterscheidbare präsynaptische DA D2-Autorezeptoren regulieren insbesondere die DA-Synthese und DA-Freisetzung im somatodendritischen oder axonalen Bereich der DAergen Neurone (Deutch und Roth, 1999; O'Hara et al., 1996). Die spezifische somatodendritische nicht-synaptische Verteilung von DA D3-Rezeptoren auf DAergen Neuronen des ventralen Mesencephalons lässt ebenfalls Autorezeptorfunktion vermuten (Diaz et al., 2000).

1.2.4. Verteilung und Lokalisation der Dopamin-Rezeptoren im mesostriatalen System

DA-Rezeptoren sind im mesostriatalen Projektionssystem sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert. Im dorsalen und ventralen Striatum findet sich die höchste Dichte an DA D1- und D2-Rezeptor mRNA. DA D3-Rezeptor mRNA und Protein finden sich prominent im Acb, im frontoparietalen Kortex und in den mesencephalen Zellgruppen A8 – A10, dort somatodendritisch nicht-synaptisch lokalisiert (Diaz et al., 2000; Sokoloff et al., 1990). DA D4- und D5-Rezeptoren werden nicht im Striatum sondern bevorzugt u.a. im frontalen Kortex, der Amygdala oder dem Hippokampus exprimiert (siehe (Sealfon und Olanow, 2000). Im Mittelhirn werden präsynaptische DA D2-Autorezeptoren von DAergen Neuronen der SNC und des VTA somatodendritisch exprimiert (Filloux et al., 1988; Wamsley et al., 1989). Im dorsalen Striatum sind postsynaptisch DA D1- und D2-Rezeptoren auf den MSN lokalisiert, wobei bisher davon ausgegangen wurde, dass D1-Rezeptoren auf den striatonigralen MSN kolokalisiert mit SP/DYN exprimiert werden, D2-Rezeptoren hingegen auf den striatopallidalen Projektionsneuronen, kolokalisiert mit ENK (Albin et al., 1989). Neuere Befunde liefern jedoch Evidenzen, dass zum einen die striatofugalen Projektionen kollateralisieren (Parent et al., 2000), und dass D1- und D2-Rezeptoren auf den MSN funktionell kolokalisiert vorliegen (Aizman et al., 2000), womit die das derzeitige Modell der funktionellen Anatomie der Basalganglien möglicherweise als zu vereinfachend anzusehen ist.

In den übrigen Kernen der Basalganglien werden die DA D1- und D2-Rezeptoren eher auf niedrigem bis moderatem Level exprimiert (Weiner et al., 1991; Yung et al., 1995), entsprechend der Dichte der DAergen Innervation (siehe Björklund und Lindvall, 1984).

1.3. Glutamat System

1.3.1. Glutamaterge Projektionssysteme

Die Aminosäure L-Glutamat (und entsprechend L-Aspartat [ASP]) ist der erregende Transmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) der Säugetiere und wird von einer grossen Anzahl von Neuronen zur schnellen synaptischen Transmission benutzt. Bei der Ratte vermitteln die exzitatorischen Aminosäuren (EAAs) die erregende Aktivität der kortikokortikalen und kortikofugalen Projektionswege. Darüberhinaus benutzen ein Grossteil der thalamischen Projektionen, die hippokampalen Projektionswege und die Parallelfaserssysteme des Zerebellums EAAs zur Übertragung ihrer Information (siehe Cotman et al., 1987).

1.3.2. Glutamat-Synthese und -Abbau

Der Neurotransmitter GLU wird lokal im ZNS intraneuronal synthetisiert, durch Transaminierung des α -Ketoglutarat, das dem Glukose-Metabolismus entstammt. Zusätzlich kann GLU direkt aus Glutamin durch eine mitochondriale Glutaminase gebildet werden. GLU wird über einen vesikulären Transporter in Speichervesikel aufgenommen und Ca^{2+} -abhängig nach Depolarisation freigesetzt. Die Inaktivierung erfolgt durch die hochaffine Wiederaufnahme über plasmamembranständige GLU-Transporter, die hauptsächlich auf Gliazellen lokalisiert sind, wenige davon auf Neuronen. In den Gliazellen wird GLU akkumuliert und abgebaut zu Glutamin durch die GLU Synthase. Glutamin wird in Neurone transportiert und dort zu GLU konvertiert. Die GLU-Freisetzung wird über präsynaptische metabotrope GLU-Autorezeptoren gesteuert (siehe 1.3.3.) (Zusammenfassung in Deutch und Roth, 1999).

1.3.3. Glutamat-Rezeptoren

Im ZNS des Säugers werden die GLU-Rezeptoren in zwei Kategorien unterschieden: (i) die Kategorie der Ionenkanal-bildenden ‚ionotropen‘ GLU-Rezeptoren und (ii) die ‚metabotropen‘ GLU-Rezeptoren, die über G-Poteine an intrazelluläre Signaltransduktionswege gekoppelt sind (aktuelle Zusammenfassungen zu Struktur, Funktion und Pharmakologie der ionotropen und metabotropen GLU-Rezeptoren finden sich in Conn und Pin, 1997; Michaelis, 1998). Die ligandengesteuerten ionotropen GLU-Rezeptoren werden weiterhin aufgrund ihrer spezifischen Liganden in die Familien der NMDA- und nicht-NMDA-Rezeptoren unterteilt. Da sich die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ausschliesslich mit der Rolle der GLU-Transmission, die über NMDA-Rezeptoren vermittelt wird, befassen, soll hier nur auf diese Familie der GLU-Rezeptoren detaillierter eingegangen werden.

Physiologisch zeichnet sich der NMDA-Rezeptor, neben der selektiven Na^+/K^+ -Leitfähigkeit, durch seine hohe Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen aus. Darüberhinaus ist der Ionenkanal spannungsabhängig durch ein Mg^{2+} -Ion blockiert, nur durch eine Membrandepolarisation und gleichzeitige Ligandenbindung wird der Ionenstrom durch den Kanal ermöglicht. Diese Besonderheiten als Ca^{2+} -permeabler ‚Koinzidenzdetektor‘ verleiht dem NMDA-Rezeptor eine wichtige physiologische Funktion bei der Regulation intrazellulärer Prozesse und der Anpassung der neuronalen Eigenschaften.

Neben der Bindungsstelle für die spezifischen Agonisten GLU, ASP und NMDA verfügt der NMDA-Rezeptor über eine Reihe von extrazellulären Bindungsstellen für Agonisten, Antagonisten und Modulatoren (Abb. 5), von denen die Polyaminbindungsstelle eine von mehreren allosterischen Modulationsstellen darstellt (siehe Yamakura und Shimoji, 1999).

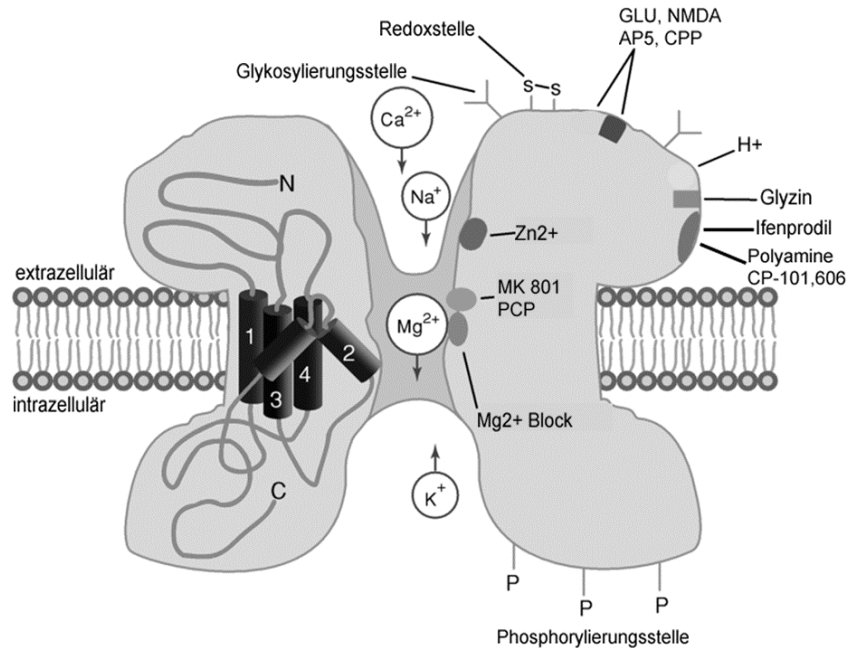


Abb. 5: Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptors und seiner spezifischen Bindungsstellen für Agonisten, Antagonisten und Modulatoren. Die Polyaminbindungsstelle auf der NR2B SU enthält eine spezifische Bindungsstelle für die endogenen Polyamine (z.B. Spermin) und den Antagonisten CP-101,606 und eine spezifische Bindungsstelle für den Antagonisten Ifenprodil. Die Bindungsstelle für den Koagonisten Glyzine und die Protonen (H⁺)-Bindungsstelle befinden sich auf der NR1 SU. Die Agonisten Glutamat (GLU) und NMDA und die kompetitiven Antagonisten AP5 und CPP binden an die extrazellulären Domäne der NR2 Untereinheiten, die Antagonisten MK 801 und PCP binden nicht-kompetitive im Kanal. Intrazelluläre Phosphorylierung aller SUs durch spezifische Proteinkinasen wirkt modulatorisch auf die Rezeptoreigenschaften (adaptiert von Hollmann und Heinemann, 1994 in Waxham, 1999).

NMDA-Rezeptor Kanal Untereinheiten

Der funktionelle NMDA-Rezeptor ist ein heteromerer Kanal, der sich wahrscheinlich aus 5 Proteinuntereinheiten (SUs) zusammensetzt. Bislang sind 6 verschiedene SUs identifiziert worden, NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D und NR3 (über die Funktion der NR3 SU im adulten Gehirn ist bisher wenig bekannt (Adams et al., 1995)), die jeweils von einem eigenen Gen kodiert werden. Für die NR1 SU sind derzeit 8 verschiedene ‚splice‘ Varianten mit unterschiedlicher Physiologie bekannt. Die NR2 SUs enthalten die Bindungsstelle für GLU, die NR1 SU dagegen die Bindungsstelle für den Koagonisten Glyzin. Biochemische und pharmakologische Evidenzen deuten darauf hin, dass sich das Rezeptor-Pentamer aus zwei NR1 und zwei unterschiedlichen NR2 SUs zusammensetzt um *in vivo* einen funktionellen Rezeptor zu bilden, wodurch wiederum dessen jeweilige Physiologie hinsichtlich Ligandenaffinität, Leitfähigkeit und Kanalöffnungskinetik bestimmt wird (siehe Yamakura und Shimoji, 1999).

Polyaminbindungsstelle

Die endogenen Polyamine Spermidin und Spermin binden spezifisch an die Polyaminbindungsstelle der NR2B SU, wo sie die Inhibition des NMDA-Rezeptors durch Protonen verändern. Die allosterische Modulation des NMDA-Rezeptors durch Protonen (die Bindungsstelle ist in der NR1 SU enthalten) gewährleistet eine spannungsunabhängige, nicht-kompetitive Inhibition des NMDA-Rezeptors bei einem physiologischen pH, in dem die Öffnungshäufigkeit und -dauer des Einzelkanals reduziert wird. Die endogenen Polyamine wirken nun unter physiologischen Bedingungen stimulatorisch auf die Häufigkeit der Kanalöffnung und damit auf die Aktivität des Rezeptors, in dem u.a. die Protonen-Inhibition des NMDA-Rezeptors entfernt wird. Diese Glyzin-insensitive Art der Rezeptor-Stimulation durch Polyamine erfordert die NR2B SU, woraus zu schließen ist, dass eine enge Verbindung zwischen der Polyaminbindungsstelle der NR2B SU und der Protonenbindungsstelle der NR1 SU hinsichtlich deren modulatorischen Aktivität existiert (Zusammenfassungen in Chenard und Menniti, 1999; Yamakura und Shimoji, 1999). Davon ausgehend, inhibieren selektive Antagonisten der Polyaminbindungsstelle den NMDA-Rezeptor spannungsunabhängig, in dem sie die Öffnungshäufigkeit und -dauer des Kanals reduzieren (Chenard und Menniti, 1999).

1.3.4. Verteilung und Lokalisation von NMDA-Rezeptoren und deren Untereinheiten

Die Verteilung der mRNA für die NR1 SU im adulten Gehirn ist nahezu ubiquitär, was für das Nagerhirn und auch teilweise beim Primaten und Menschen gezeigt wurde (Rigby et al., 1996; Watanabe et al., 1993). Weiterhin ist die NR2A SU ebenfalls im gesamten ZNS verbreitet, während die NR2B SU auf das Vorderhirn beschränkt ist. Beim Säuger findet sich die höchste Expression der NR2B mRNA im Striatum, Kortex und Hippokampus (Charton et al., 1999; Kosinski et al., 1998; Rigby et al., 1996; Standaert et al., 1994; Watanabe et al., 1993). Sowohl beim Menschen, als auch bei der Ratte wird die NR2B SU von allen striatalen Neuronentypen exprimiert, inklusive der Projektionsneurone (Chen et al., 1996; Küppenbender et al., 2000). Die NR2C SU wird vornehmlich in der granulären Zellschicht des Zerebellums exprimiert, während die NR2D SU auf das Diencephalon und den Hirnstamm beschränkt ist (siehe Chenard und Menniti, 1999; Yamakura und Shimoji, 1999). In der Regel ist der NMDA-Rezeptor postsynaptisch lokalisiert, wenige ultrastrukturelle Untersuchungen können jedoch auch eine geringe präsynaptische Lokalisation an symmetrischen und asymmetrischen Synapsen zeigen (Charton et al., 1999; Farb et al., 1995; Gracy und Pickel, 1995).

1.4. Pathophysiologie der Basalganglien bei der Parkinson-Krankheit

Der Pathophysiologie der Basalganglien bei der Parkinson-Krankheit liegt eine selektive Degeneration des mesostriatalen DA-Systems zugrunde. Die Konsequenz ist eine Abnahme des DA-Tonus insbesondere an den MSN im dorsalen Striatum und damit eine Verschiebung der Transmitterbalance zugunsten der kortikostriatalen GLU-Transmission. An den MSN der ‚indirekten‘ Bahn überwiegt bei DA-Mangel die GLUerge Erregung, die in einer verstärkten Hemmung des LGP resultiert. Dies hat wiederum unmittelbar oder über die Disinhibition des STN eine erhöhte inhibitorische Aktivität der Ausgangskerne MGP/SNR zur Folge, so dass die thalamokortikale Projektion gehemmt wird (Abb. 6). Dies

stellt das neuronale Substrat der Symptome Akinese und des Rigors dar. Somit lässt sich auf der Ebene des Striatums eine *relative*, auf Ebene der Ausgangsstrukturen jedoch eine *absolute* GLU-Überaktivität erkennen (Schmidt, 1995), die das Parkinson Syndrom primär als ein DA-Hypofunktionssyndrom und sekundär als ein GLU-Hyperfunktionssyndrom definieren lassen (Starr et al., 1997).

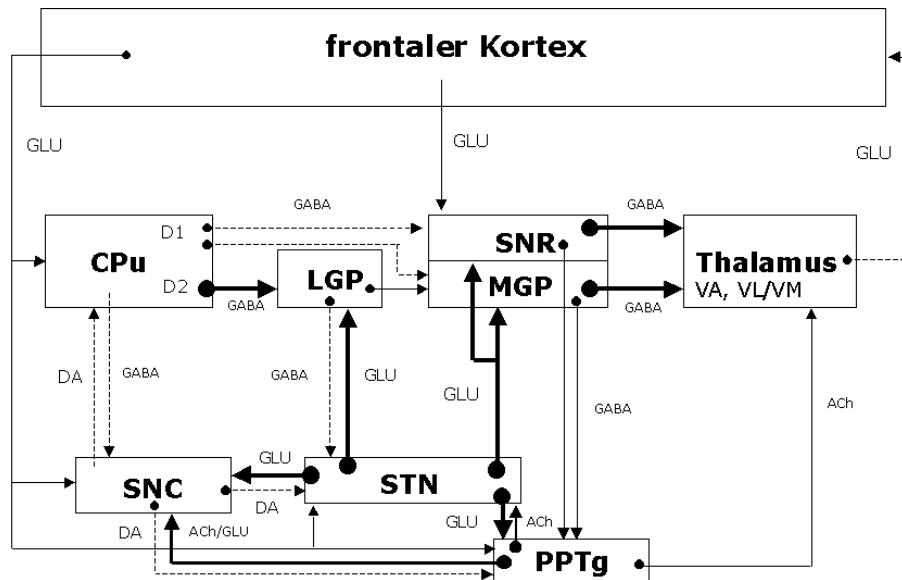


Abb. 6: Schematische Darstellung der veränderten Transmitterbalancen nach Degeneration des mesostriatalen DA-Systems bei der Parkinson-Krankheit. CPU, Nucleus caudatus/putamen; LGP, Globus pallidus pars lateralis; MGP, Globus pallidus pars medialis; PPTg, Nucleus tegmentalis pedunculopontinus; SNC, Substantia nigra pars compacta; SNR, Substantia nigra pars reticulata; STN, Nucleus subthalamicus; VA/VL/VM, Nucleus ventroanterior/ventrolateralis/ventromedialis thalami; ACh, Acetylcholin; DA, Dopamin; GABA, γ -Aminobuttersäure; GLU, Glutamat; Dicke Pfeile: Überaktivität; gestrichelte Pfeile: Unteraktivität (nach Schmidt et al., 1992).

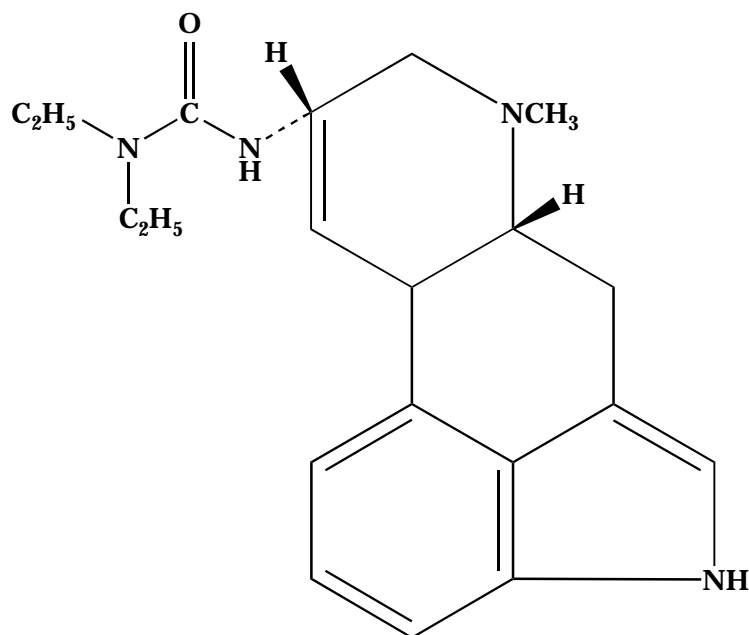
Basierend auf diesen Veränderungen der Transmitterbalancen im Funktionsmodell der Basalganglien lassen sich zwei mögliche Therapiestrategien zur Wiederherstellung des physiologischen Gleichgewichts bei der Parkinson-Krankheit erkennen.

1.4.1. Dopamin-Substitution

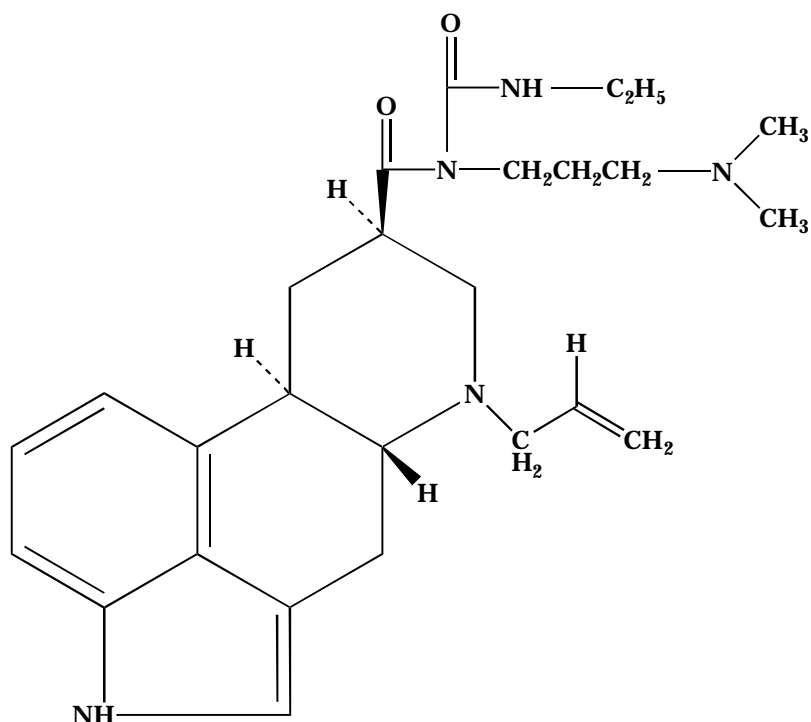
Seit seiner Entdeckung in den späten 50iger Jahren durch Carlsson stellt die DA-Substitution mit dem DA-Vorläufer L-DOPA den ‚Goldstandard‘ in der symptomatischen Parkinson-Therapie dar (siehe Obeso et al., 2000a). In Kombination mit peripher wirksamen L-AADC-Hemmern reduziert L-DOPA die Parkinson-Symptome Akinese und Rigor (Cotzias et al., 1969; Yahr et al., 1969) insbesondere in frühen bis mittleren Stadien der Erkrankung. Neuere Entwicklungen zur DA-Substitution involvieren die Inhibition der DA-degradierenden Enzyme MAO-B (L-Deprenyl) und COMT (Tolcapone) sowie die direkte Stimulation postsynaptischer DA-Rezeptoren mit selektiven Agonisten (z.B.: Apomorphin, Bromocriptin, Lisurid, Cabergolin) (Zusammenfassung in Hagan et al., 1997). Die insbesondere mit der L-DOPA Therapie verbundenen schweren Nebenwirkungen wie Psychosen und Dyskinesien (siehe 5.1.) limitieren jedoch dessen Anwendungsbereich und lassen über den frühen

kombinierten bzw. alleinigen Einsatz von DA-Rezeptor-Agonisten nachdenken (zur aktuellen Diskussion siehe Nutt und Carter, 2000; Olanow et al., 2000). Hierbei erscheint aufgrund der pathophysiologischen Verhältnisse im Striatum die selektive Wiederherstellung des DA-Tonus an DA D2-Rezeptoren als besonders geeignet.

Die Substanzklasse der Ergoline, Abkömmlinge der natürlich vorkommenden Ergotalkaloide aus *Claviceps purpurea* (Fr.), bietet ein Reihe DAerg wirksamer Substanzen die bereits in der Parkinson Therapie Anwendung finden (Mantegani et al., 1999). Hierzu zählen die DA D2-Rezeptor Agonisten Lisurid und Cabergolin, deren pharmakologische Eigenschaften im folgenden charakterisiert werden sollen.



Lisurid (N-(D-6-methyl-8-isoergolenyl)-N',N'-diethylcarbamid hydrogenmaleat) besitzt die grösste Selektivität für DA D2-Rezeptoren, hat jedoch auch eine vergleichbare Affinität zu den D3-Subtypen der D2-Rezeptorfamilie. Darüberhinaus ist Lisurid ein partieller Antagonist/Agonist am D1-Rezeptor. Die antiparkinsonoide Wirkung im Tierexperiment und im Parkinson Patienten wird demnach hauptsächlich über die D2-agonistische Wirkung vermittelt, möglicherweise verstärkt die D1-Rezeptor Aktivierung die D2-Rezeptor vermittelten Wirkungen (Blanchet, 1999). Neben der Selektivität für DA-Rezeptoren bindet Lisurid ebenfalls an NAerge α_2 -Rezeptoren und wirkt als 5-HT-Agonist an 5-HT₁- und 5-HT₂-Rezeptoren, was wahrscheinlich zu den beobachteten psychotropen Nebenwirkungen sowie Hyperthermie und Hypotension beiträgt (siehe Blanchet, 1999; Przuntek, 1988). Lisurid ist mit einer Plasmaeliminationshalbwertszeit von 2 – 4 h ein kurzwirksamer DA – Rezeptor-Agonist (Hümpel et al., 1981).

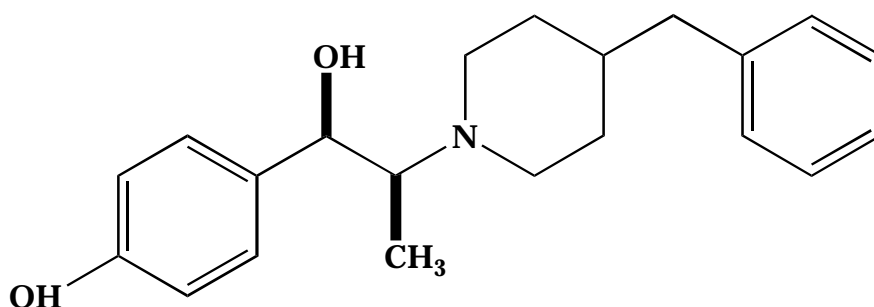


Cabergolin (1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-3-(6'-allylergoline-8'-beta-carbonyl)-urea) bindet mit grosser Affinität an DA D2- und D3-Rezeptoren und mit einer 50fach geringeren Affinität an D1-Rezeptoren. Moderate Affinitäten besitzt Cabergolin für α_2 -Rezeptoren und 5-HT₁-Rezeptoren (Fariello, 1998; Hagan et al., 1997). Cabergolin reduziert die Parkinson-Symptome im Tierexperiment und im Parkinson Patienten (Blanchet, 1999; Hagan et al., 1997) mit einem geringen psychotropen Potential, oder dem Risiko Dyskinesien auszulösen (Grondin et al., 1996; Miyagi et al., 1996a). Damit stellt Cabergolin einen potenten DA D2-Rezeptor-Agonisten dar, der mit einer Plasmaeliminationshalbwertszeit von 65 h (Benedetti et al., 1990) ein langwirksames pharmakodynamisches und -kinetisches Profil liefert.

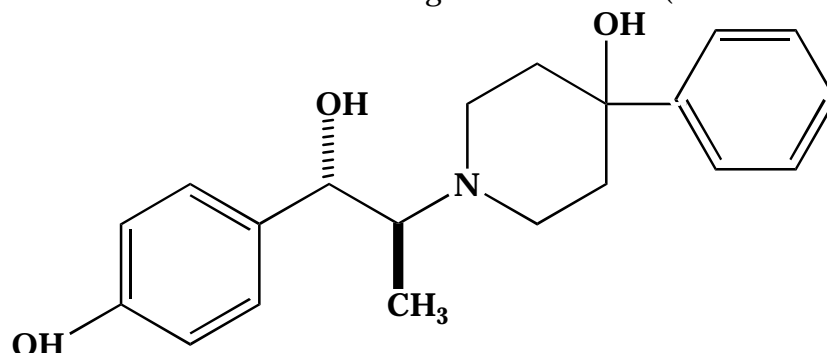
1.4.2. Anti-Glutamaterge Therapie mit NMDA-Rezeptor Antagonisten

In verschiedenen Tiermodellen der Parkinson-Krankheit, die die Symptome Akinese und Rigor darstellen (siehe 1.7.), konnte die antikataleptische und antiakinetische Wirkung von GLU-Rezeptor-Antagonisten gezeigt werden. Sowohl die systemische Applikation als auch die lokale Infusion von kompetitiven und nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten in das Striatum oder die Ausgangsstrukturen der Basalganglien kann die Verhaltensdefizite infolge einer DA-Denervation reduzieren oder aufheben (Zusammenfassung in Schmidt und Kretschmer, 1997). In der Pharmakotherapie von Parkinson Patienten finden derzeit die 1-Aminoadamantane Amantadin, Memantin und Budipin Anwendung, insbesondere in Kombination mit der L-DOPA Therapie, um deren Wirkung zu verstärken und die dyskinetischen Nebenwirkungen zu reduzieren (Zusammenfassung in Pedersen und Schmidt, 2000a) (siehe 6.1.). Die tierexperimentellen Befunde machen deutlich, dass die antiparkinsonoide Wirkung der anti-GLUergen Behandlung durch eine Reduktion der GLU-Hyperaktivität im Striatum und in den Ausgangsstrukturen der Basalganglien vermittelt wird (Schmidt und Kretschmer, 1997). Jedoch limitiert das psychotomimetische (Schmidt, 1994) und neurotoxische Potential (Olney et al., 1989), insbesondere der potenten kompetitiven und nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten deren langfristigen klinischen Einsatz.

Neben den 1-Aminoadamantanen, die als schwache Kanalblocker des NMDA-Rezeptors wirken (Danysz et al., 1997), verfügt die Substanzklasse der Phenylethanolamin-Derivate, mit deren Prototyp Ifenprodil (Williams, 1993), über ein vielversprechendes pharmakologisches Profil für den Einsatz in der Parkinson Therapie. Diese NR2B-selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten zeichnen sich durch einen aktivitätsabhängigen Wirkmechanismus aus (Kew und Kemp, 1998) (siehe 1.3.3.), der nur die überaktive GLU-Transmission blockiert, während die physiologische Signalübertragung und damit assoziierte Prozesse unbeeinflusst bleiben (siehe 6.1.). Unerwünschte Nebenwirkungen wie Psychosen, Lern- und Gedächtnisstörungen und Neurotoxizität, die durch die bisherigen NMDA-Rezeptor-Antagonisten ausgelöst wurden, konnten bisher nicht beobachtet werden (Scatton, 1994) und werden der NR2B SU-Selektivität und der aktivitätsabhängigen Blockade zugeschrieben (Zusammenfassung in Pedersen und Schmidt, 2000a; Yamakura und Shimoji, 1999).



Ifenprodil ist ein atypischer nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor Antagonist, der den NR1/NR2B-Kanal selektiv inhibiert (Williams, 1993). Die Affinität für die NR1/NR2A oder NR1/NR2C ist um den Faktor 400 geringer, darüberhinaus zeigt Ifenprodil Affinität für α_1 -Rezeptoren, die um den Faktor 3 geringer ist als die NR2B-selektive Affinität (Zusammenfassung in (Chenard und Menniti, 1999). Im Tierexperiment zeigt Ifenprodil antikataleptische und antiparkinsonoide Wirkung ohne psychotomimetische Nebenwirkungen (Mitchell und Carroll, 1997; Nash et al., 1999), antiparkinsonoide Wirkung beim Menschen konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden (Montastruc et al., 1997).



CP-101,606 ((1S,2S)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-(4-(1-hydroxyphenyl)piperidin-1-yl)-1-hydroxypropan-2-yl)ethan-1-ol) ist eine dem Ifenprodil strukturell verwandte Substanz, deren Affinität für den NR2B-Kanal ähnlich der von Ifenprodil ist, allerdings besitzt CP-101,606 auch nicht unwesentliche Affinitäten für die NR2A- (2-fach geringer) und NR2C (100-fach geringer)-Kanäle. Ebenso wie Ifenprodil bindet CP-101,606 an α_1 -Rezeptoren mit einer ca. 50-fach geringeren Affinität (Chenard und Menniti, 1999). CP-101,606 zeigt im Tierexperiment antiparkinsonoide Wirkung (Steece-Collier et al., 2000), vergleichbare Studien an Parkinson Patienten liegen derzeit nicht vor.

Obwohl Ifenprodil und CP-101,606 nahe strukturelle Verwandtschaft zeigen bindet CP-101,606 wahrscheinlich an der Polyaminbindungstelle am gleichen Aminosäurerest, an dem auch die endogenen Polyamine binden, Ifenprodil interagiert wahrscheinlich selektiv mit einem anderen Aminosäurerest (Abb. 5) (siehe Chenard und Menniti, 1999).

1.5. Neurodegenerative Prozesse der Parkinson-Krankheit

Seit der Entdeckung, dass der Parkinson-Krankheit eine selektive Degeneration des mesostriatalen DA-Systems zugrunde liegt (Ehringer und Hornykiewicz, 1960), ist das *primum movens* des degenerativen Prozesses, der zunächst selektiv die neuromelaninhaltigen DAergen Neurone der SNC betrifft, unbekannt. Mehrere Faktoren sind heute bekannt (Abb.7), die jeder für sich Neurodegeneration auslösen kann, jedoch konnte bisher keiner davon ausschliesslich kausal mit der Ätiopathogenese der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht werden. Vielmehr scheint der Prozess der Degeneration multifaktoriell bedingt zu sein. Mit Ausnahme der hereditären Form der Erkrankung (siehe 1.5.5.) beträgt das mittlere Erkrankungsalter 55 - 60 Jahre, was dem Zeitpunkt entspricht zu dem die klinischen Symptome auffällig werden. Da der Neuronenverlust zu diesem Zeitpunkt bereits 50 - 60 % beträgt (Fearnley und Lees, 1991), wird in den derzeit diskutierten Modellen zur Progression des Zelltods in der SNC, die sich sowohl auf *post mortem* Untersuchungen als auch funktionell bildgebende Verfahren beim Parkinson Patienten stützen, davon ausgegangen, dass die striatale DA-Funktion innerhalb einer präklinischen Phase von 4 -5 Jahren progressiv abnimmt (Brooks, 1998). Dies wiederum spricht für das ‚one hit‘ Modell der nigrostriatalen Degeneration, in dem *das* schädigende Ereignis zufallsmässig neuronalen Zelltod in der SNC auslöst, dem eine eher rapide, exponentielle Abnahme der Neuronen bis zur kritischen Schwelle der Symptomausprägung folgt (Clarke et al., 2000; Dunnett und Björklund, 1999). Sowohl für das initiale schädigende Ereignis als auch für die anschliessende progressive Degeneration werden mehrere, konzeptionell unterscheidbare Mechanismen verantwortlich gemacht, die sich wahrscheinlich gegenseitig beeinflussen und verstärken und somit zu neuronaler Dysfunktion, Atrophie und schliesslich zum Zelltod führen (Abb.7). Hierbei spielen wahrscheinlich die Faktoren ‚oxidativer Stress‘, ‚mitochondriale Dysfunktion‘ und ‚Exzitotoxizität‘ sowohl bei der initialen Degeneration, als auch bei der Progression Schlüsselrollen (Abb.7) (aktuelle Zusammenfassungen in Dunnett und Björklund, 1999; Olanow und Tatton, 1999).

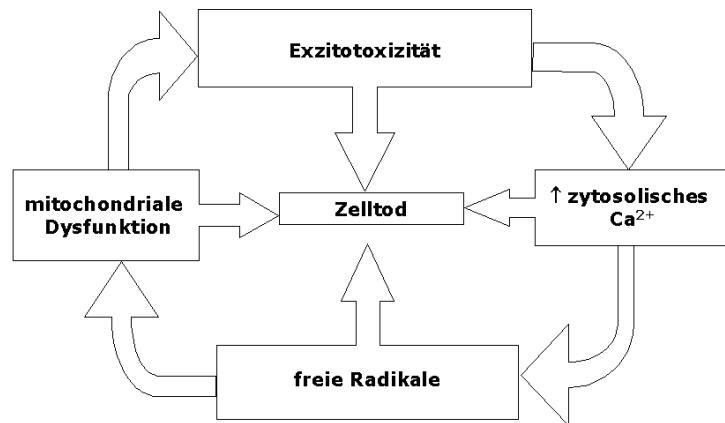


Abb. 7: Darstellung der Hypothese, dass ein ‚lethales Triplet‘ aus oxidativem Stress, mitochondrialer Dysfunktion und Exzitotoxizität verbunden mit Ca²⁺-Einstrom zum Zelltod beitragen und sich gegenseitig verstärken (nach Olanow et al., 1998).

1.5.1. Das Konzept der langsamen, ‚energie-gebundenen Exzitotoxizität‘

Parallel zu den Studien, die GLU als Neurotransmitter etablierten, zeigten die ersten Experimente, dass GLU ebenso nekrotische Läsionen in der Retina von Mäusen auslösen kann (Lucas und Newhouse, 1957). Basierend auf den Befunden, dass GLU akuten Zelltod im Rückenmark und ZNS von Säugern induziert, wurde das Konzept der ‚Exzitotoxizität‘ entwickelt (Olney, 1978), wonach der neurotoxische Effekt von GLU als unmittelbare Interaktion mit den Rezeptoren, die die exzitatorische Wirkung vermitteln, postuliert wurde. Die akute GLU-induzierte Exzitotoxizität wird durch eine Kaskade zellulärer Ereignisse beschrieben, bei denen der NMDA-Rezeptor eine entscheidende Rolle spielt (Choi, 1988; Rothman und Olney, 1987). Dieser sich selbst verstärkende GLUerge Kreislauf (Doble, 1999), besteht aus drei wesentlichen Elementen die parallel ablaufen: (i) Na⁺-Einstrom durch spannungsabhängige Na⁺-Kanäle nach Depolarisation; (ii) Zunahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch den desensitivierten NMDA-Rezeptor und spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle sowie durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern; (iii) Ca²⁺-abhängige Exozytose von GLU an den Axonendigungen. Diese Ereignisse fördern weiterhin die osmotische Imbalance und Ca²⁺-abhängige Aktivierung von Nukleasen, Proteasen, Kinasen und Lipasen, deren Reaktionen wiederum zur Bildung freier Radikale und Stickstoffoxid führt, und somit zur ultimativen Exekution des Zelltods (Zusammenfassung in Doble, 1999). Diese Form des akuten exzitotoxischen Zelltods spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese akuter neurologischer Erkrankungen wie bei Schlaganfällen und epileptischen Anfällen (Choi, 1988; Rothman und Olney, 1987).

Davon abgeleitet wurde das Konzept der langsamen oder ‚energie-gebundenen Exzitotoxizität‘ (Henneberry et al., 1989; Zeevalk und Nicklas, 1990), das eine selektive Vulnerabilität von Neuronen gegenüber normalen extrazellulären GLU-Konzentrationen aufgrund eines gestörten Energiestoffwechsels beschreibt. Hierbei stellt ein Energiedefizit, bedingt durch mitochondriale Dysfunktion oder Inhibition der Atmungskette *das* pathogene

Ereignis dar (Abb. 8). Die Folge ist eine Abnahme des ATP-Gehalts, die gestörte Funktion der Plasmamembran Na^+/K^+ -ATPase und eine partielle Depolarisation des Neurons. Dies wiederum führt dazu, dass der Mg^{2+} -Block des NMDA-Rezeptors freigesetzt wird und den Rezeptor somit hypersensitiv gegenüber der Stimulation durch GLU macht. Somit können physiologische extrazelluläre GLU-Konzentrationen die exzitotoxische Kaskade in Gang setzen. Infolge werden aktive Transportprozesse inhibiert, was zum einen zu einer Akkumulation extrazellulären GLU führt, aber auch zu einer Azidifizierung des Milieus. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Experimente bestätigen das Konzept, dass eine primäre Störung der mitochondrialen Energieversorgung Neurone gegenüber der sekundären Exzitotoxizität sensitiviert (Zusammenfassungen in Doble, 1999; Pedersen und Schmidt, 2000a). Sowohl ‚langsame Exzitotoxizität‘, bei der der GLU-Tonus chronisch erhöht ist, als auch ‚energie-gebundene Exzitotoxizität‘, wobei die physiologische GLU-Transmission degenerative Effekte auf energie-defiziente Neuronen hat, sind wahrscheinlich in die chronische Neurodegeneration der Parkinson-Krankheit involviert. Eine neueste tierexperimentelle Studie zeigt, dass die chronische systemische Verabreichung von Rotenon, einem hochaffinen spezifischen Inhibitor des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, der weiten Einsatz als Pestizid in der Landwirtschaft findet, sehr selektiv nigrostriatale Degeneration bei der Ratte auslöst. Diese ist verbunden mit Parkinson-Symptomen und der Akkumulation von Lewy Körpern in den Neuronen der SNC (Betarbet et al., 2000). Diese Evidenz unterstützt die Überlegung, dass eine chronische Exposition gegenüber einer geringen Dosis von Umweltgiften wie z.B. Rotenon eine permanente mitochondriale Dysfunktion verursacht, die als Grundlage für die ‚energie-gebundene Exzitotoxizität‘ kausal das primär schädigende Ereignis bedingt (siehe Beal, 2000).

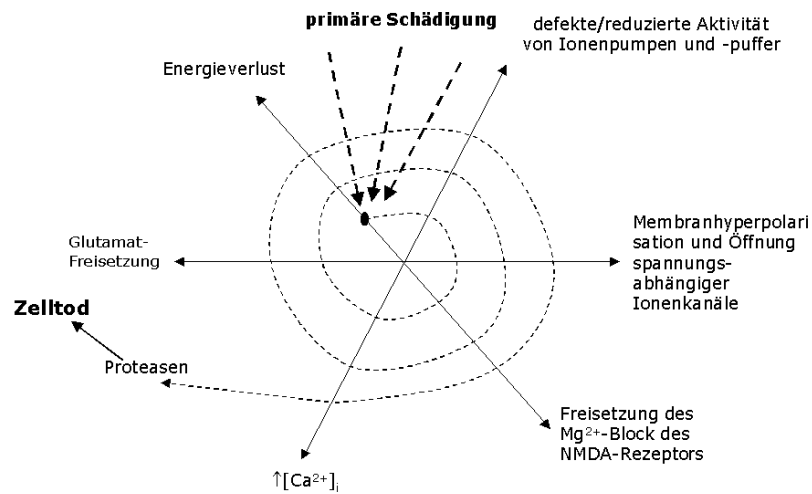


Abb. 8: Konzept der ‚energie-gebundenen Exzitotoxizität‘. Ein initial schädigendes Ereignis (Neurotoxin, Umweltgift) verursacht zunächst eine limitierte Störung der intrazellulären Homöostase. In einem Keislauf sich gegenseitig bedingender Ereignisse wird die mitochondriale Dysfunktion verstärkt, es kommt zum Einstrom von Ca^{2+} , Membrandepolarisation und schliesslich zur Desensitivierung des NMDA-Rezeptors. Übersteigt der Ca^{2+} -Einstrom eine gewisse Schwelle, werden Proteasen wie Caspasen aktiviert, die schliesslich zur Exekution des Zelltods führen (nach Nicotera et al., 1999).

1.5.2. Selektive Vulnerabilität bei der ‚nigralen‘ Pathologie

Bestimmte Suszeptibilitätsfaktoren können als Prärequisit für die selektive Vulnerabilität der DAergen Projektionsneurone der SNC gegenüber einer ‚energie-gebundenen Exzitotoxizität‘ angesehen werden. Zunächst trägt der Neurotransmitter DA selbst durch Autoxidation oder durch die enzymatische Degradation durch die MAO-B zu einer erhöhten Produktion freier Radikale (insbesondere reaktive Sauerstoffspezies, ROS) bei. Ebenso kann eine normale, oder erhöhte DA-Freisetzung zur Bildung von ROS führen. Die Beseitigung der physiologisch anfallenden ROS erfordert wiederum energieabhängige intrazelluläre Prozesse, die die Neurone möglicherweise in einen anhaltenden energie-defizienten Zustand, bereits unter physiologischen Bedingungen, versetzen. Weiterhin bedingt die Bildung freier Radikale eine zusätzliche Kompromittierung der mitochondrialen Funktion. Somit stellt der Neurotransmitter DA allein bereits einen Risikofaktor für eine mögliche ‚energie-gebundene Exzitotoxizität‘ dar, die chronische Exposition gegenüber mitochondrialen Toxinen kann nun hier einen zusätzlichen Faktor darstellen, der das Energiedefizit permanent erhöht.

Das spezifische Degenerationsmuster in der SNC von Parkinson Patienten, zeigt jedoch regionale Unterschiede in der Vulnerabilität (Hirsch et al., 1988). So sind die Neurone der ventrolateralen SNC von der Degeneration am stärksten betroffen (Fearnley und Lees, 1991), wohingegen die DAergen Neurone des medial gelegenen VTA erst sehr spät degenerieren (German et al., 1992). Dies impliziert weitere Vulnerabilitätsfaktoren über den DAergen Phänotypen hinaus, die zum einen durch GLUerge Afferenzen im somatodendritischen Bereich aber auch durch die Fähigkeit die endogene Ca^{2+} -Homöostase aufrecht zu erhalten, bestimmt werden.

Glutamaterge Afferenzen

Die SNC erhält prominente GLUerge Afferenzen aus dem Kortex, dem STN und dem PPTg (Abb. 1) und die Neurone der SNC exprimieren NMDA-Rezeptoren, die massgeblich an der GLUergen Signalübertragung in der SNC beteiligt sind (siehe Blandini et al., 2000a). Basierend auf dem Konzept der ‚energie-gebundene Exzitotoxizität‘ stellt dies eine ausreichende physiologische GLUerge Stimulation über NMDA-Rezeptoren dar, um den initialen Zelltod bereits energie-defizienter SNC Neurone auszulösen. Die Tatsache, dass sowohl der STN als auch der PPTg bereits in frühen Stadien der Erkrankung überaktiv werden (Abb. 6), unterstützt die Überlegung, dass die Progression der Degeneration durch eine GLUerge Überstimulation angetrieben wird (Blandini et al., 2000a; Pedersen und Schmidt, 2000a). Hiernach definiert das spezifische Innervationsmuster aus diesen Kernen die Vulnerabilität der SNC Neuronenpopulationen.

Differentielle Expression Calcium-bindender Proteine

Calbindin D_{28K} (CB) ist ein Ca²⁺-bindendes Protein (CaBP) der EF-Hand Supergenfamilie, das im gesamten Säuger ZNS verbreitet ist und im ventralen Mesencephalon kolokalisiert mit DA in einigen DAergen Neuronenpopulationen. CaBPs tragen zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Ca²⁺-Homöostase bei, in dem sie als Ca²⁺-Puffer wirken (siehe Hontanilla et al., 1998). Diese Ca²⁺-Pufferkapazität wiederum trägt entscheidend zur Fähigkeit bei, mit Ca²⁺-vermittelten intrazellulären Prozessen, einschliesslich Exzitotoxizität, umzugehen (Lee et al., 1997). Unter diesem Aspekt erscheint die regional unterschiedliche Verteilung von CaBP, insbesondere von CB in Neuronen der SNC und des VTA eine gewisse Protektion gegenüber dem Neurotoxin-verursachten Zelltod zu gewährleisten (German et al., 1992; Liang et al., 1996). Auch im Gehirn von Parkinson Patienten ist die Degeneration CB-haltiger DAergen Neurone weniger ausgeprägt, als die der Neurone ohne diesen Ca²⁺-Puffer (German et al., 1992; Hirsch et al., 1992). Weiterhin stellt das CB-haltige Neuropil der SNC einen weiteren Faktor dar, der die Vulnerabilität der darin gelegenen Neurone definiert (Damier et al., 1999b; Damier et al., 1999a) (siehe 4.1.).

1.5.3. Form des Zelltods bei der ‚nigralen Pathologie‘

Die Debatte darüber, ob die Neurone der SNC nekrotisch oder apoptotisch sterben ist nach wie vor nicht gelöst. Wahrscheinlich tragen beide Typen des Zelltods zu einem gemeinsamen Exekutionsprogramm innerhalb der SNC bei, nachdem die initiale neurotoxische Schädigung stattgefunden hat (Nicotera et al., 1999). Selektive Neurotoxine DAerger Neurone (siehe 1.6.) lösen *in vitro* und *in vivo* Zelltod in mesencephalen Neuronen aus, der nekrotische als auch apoptotische Prozesse involviert. Ebenso werden in der SNC von Parkinson Patienten morphologische und biochemische Veränderungen nachgewiesen, die mit Apoptose in Verbindung gebracht werden (siehe 4. und 6.) (Zusammenfassung in Pedersen und Schmidt, 2000a).

GLU-Rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität kann sowohl Apoptose als auch Nekrose auslösen, abhängig von der Intensität und der Dauer der Schädigung: milde Exzitotoxizität, mit vorübergehender mitochondrialer Depolarization und reversiblen Energieverlust favorisiert Apoptose, wohingegen ein intensives exzitotoxisches Ereignis zu einer irreversiblen mitochondrialen Depolarisation und damit permanenten Energieentleerung führt, das den rapiden nekrotischen Zelltod fördert (siehe Nicotera et al., 2000). Unter der Annahme, dass

der Neurodegeneration bei der Parkinson-Krankheit ‚langsame Exzitotoxizität‘ zugrunde liegt, würde dies der apoptotischen Form des Zelltods den Vorzug geben.

Caspasen und neuronale Apoptose

Der Begriff ‚Apoptose‘ beschreibt eine Form des physiologischen ‚programmierten Zelltods‘, der in verschiedenen Zelltypen u.a. in der Entwicklung beobachtet wird. Dem Prozess unterliegen distinkte morphologische Veränderungen (Zellschrumpfung, Pyknose, Chromatinkondensation, Zusammenbruch der Zytoplasmas und des Kerns), die sich von denen des pathologischen nekrotischen Zelltods unterscheiden (Kerr et al., 1972). Neuronale Apoptose wird in einer intrazellulären Kaskade durch eine Reihe von spezifischen Proteinen und Enzymen reguliert bzw. ausgeführt (siehe (Hengartner, 2000)). Hierbei spielt die Familie der Cysteinproteasen, die Caspasen, eine entscheidende Rolle bei der ultimativen Exekution des Zelltods; die Caspasen sind somit wahrscheinlich mitverantwortlich für die morphologischen Veränderungen. Caspasen liegen zytoplasmatisch konstitutiv als Zymogene vor und werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Besonders Caspase-3 und Caspase-9 spielen bei der neuronalen Apoptose entscheidende Rollen, wobei Caspase-3 durch Caspase-9 aktiviert wird. Aktivierte Caspase-3 wiederum spaltet die inaktive Form der Caspase-aktivierten DNAase, die in Folge, aktiviert, die apoptose-spezifische Degradation der genomischen DNA in 180 Basenpaar-Fragmente katalysiert (Wyllie et al., 1980). Weitere Caspase-Substrate sind Proteine des Zytoskeletts sowie Strukturproteine des Kerns und der Kernmembran, deren Spaltung folglich zu einem Abbau der entsprechenden Strukturelemente führt (Faleiro und Lazebnik, 2000, Zusammenfassungen in Hengartner, 2000; Nicholson, 1999; Nicotera et al., 2000; Yuan und Yankner, 2000). In einer Reihe von Experimenten wurde gezeigt, dass die Caspase-vermittelten Prozesse zu einem bestimmten Mass an den Energiegehalt der betroffenen Zelle gebunden sind (siehe Nicotera et al., 2000), was erklärt, dass der apoptotische Zelltod präferenziell nach milder Schädigung beobachtet wird. Neueste Untersuchungen weisen die Aktivierung von Caspase-3 im Gehirn von Parkinson Patienten nach, auch zu klinisch fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung, (Hartmann et al., 2000). Dies unterstützt bisherige Evidenzen zur DNA-Fragmentation und Chromatinkondensation in DAergen Neuronen der SNC (Anglade et al., 1997a; Anglade et al., 1997b; Tatton et al., 1998; Tatton und Kish, 1997) und zeigt, dass apoptotische Prozesse in die progressive Neurodegeneration der Parkinson-Krankheit involviert sind.

1.5.4. Modell der ‚retrograden transneuronalen Neurodegeneration‘

Ein wichtiger Aspekt hinsichtlich der selektiven Vulnerabilität der SNC Neurone ist die Tatsache, dass ausschliesslich Projektionsneurone degenerieren. Es gibt experimentelle Evidenzen die zeigen, dass die biochemische Kaskade des apoptotischen Zelltods lokal im Bereich der Synapsen und Dendriten durch eine übermässige Stimulation von GLU-Rezeptoren ausgelöst werden kann (Abb. 9) (Mattson et al., 1998). Diese Form er ‚synaptischen Apoptose‘, die an die synaptische Neurotransmission und die beteiligten Transmitter gebunden ist, kann demnach einen retrograden transneuronalen Zelltod der betroffenen Neurone auslösen. Für die Neurone der SNC würde dies bedeuten, dass die eigentlichen schädigenden Ereignisse im Bereich der Axonterminalen im Striatum initiiert werden. Diese Vermutung wurde bereits von Robertson 1992 erhoben, um die selektive Degeneration der DAergen Neurone in der SNC zu erklären (Robertson, 1992). Im Sinne der

‚energie-gebundenen Exzitotoxizität‘ stellt die DA-Freisetzung und der DA-Metabolismus zusammen mit der prominenten GLU-Transmission im Striatum somit ein neuroanatomisches Substrat für einen GLU-getriggerten präsynaptischen apoptotischen Prozess dar. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die mesostriatale DA-Transmission neben der ihrer phasischen Aktivität auch eine tonische Komponente aufweist (Grace, 1991). Es wird vermutet, dass diese tonische DA-Freisetzung lokal an den ‚spines‘ der MSN durch kortikostriatales GLU vermittelt wird, entweder direkt *via* präsynaptischer GLU-Rezeptoren auf mesostriatalen Axonen oder indirekt über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch striatale Interneurone. Dadurch entsteht ein tonischer extrazellulärer ‚DA-Pool‘, der unter physiologischen Bedingungen ausreichend ist, eine permanente Stimulation von DA D₂-Autorezeptoren zu gewährleisten (siehe Onn et al., 2000). Unter ätiopathologischem Aspekt gesehen, kann dieser tonische ‚DA-Pool‘ im Striatum eine persistierende Quelle freier Radikale darstellen und damit einen striatalen Suszeptibilitätsfaktor (siehe 1.5.2.) darstellen.

Weitere neuroanatomische und elektrophysiologische Befunde zeigen, dass DAerge Projektionsneurone *in vitro* GLUerge Synapsen ausbilden können (Sulzer et al., 1998), was die Präsenz von präsynaptischen GLU-Rezeptoren unterstützt, auch die von NMDA-Rezeptoren denkbar macht (1.3.4.). Dieses hier entwickelte Modell der ‚retrograden transneuronalen Neurodegeneration‘ basiert bisher auf wenigen experimentellen Evidenzen, bietet jedoch eine attraktive Möglichkeit, die selektive Vulnerabilität des mesostriatalen Projektionssystems für die Degeneration bei der Parkinson-Krankheit zu erklären (Pedersen und Schmidt, 2000a).

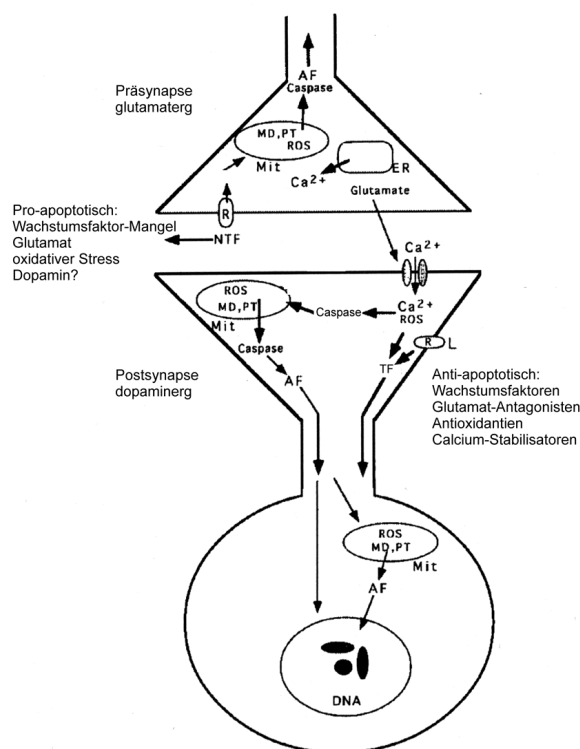


Abb. 9: Vereinfachtes Arbeitsmodell für die biochemische Kaskade die lokal im Striatum in Synapsen aktiviert wird und die ‚retrograde transneuronal Degeneration‘ in einem mesostriatalen Neuron steuert. Präsynaptische Glutamat-Freisetzung und anschließende NMDA-Rezeptor-Aktivierung führt zum Ca^{2+} -Einstrom und zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), das wiederum zur Aktivierung von Caspasen, zur Depolarisation der Mitochondrien (Mit) Membra (MD) und zu deren Permeabilitätsveränderung (PT) führt. Apoptische Faktoren (AF) werden aus den Mitochondrien freigesetzt und induzieren Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation. Die Stimulation metabotroper Rezeptoren (R) (z.B. Dopamin-Rezeptoren) kann über die Aktivierung Apoptose-assoziiierter Transkriptionsfaktoren (TF) die Kaskade verstärken. Der Mangel an Wachstumsfaktoren, chronisch aktive Glutamat-Transmission, oxidativer Stress sowie möglicherweise der Dopamin-Metabolismus sind weitere Faktoren die diese Prozesse initiieren bzw. potenzieren können (siehe Text) (modifiziert nach Mattson et al., 1998).

1.5.5. Genetische Faktoren

Obwohl die idiopathische Parkinson-Krankheit sporadisch auftritt, wird schon lange vermutet, dass eine genetische Komponente der Erkrankung existiert. Dies wird durch Fall-Kontrollstudien gestützt, die zeigen, dass die Inzidenz bei nahe Verwandten 2 – 14 fach erhöht ist; Zwillingsstudien zeigen eine hohe Konkordanz hinsichtlich striataler DAerger Dysfunktion bei Eineiigen Zwillingen von Parkinson Patienten (Gasser, 1998). Seit der Entdeckung der Punkt-Mutation (A53T) im Gen für α -Synuclein auf Chromosom 4 (4q21, Park 1-Lokus) in mehreren Familien mit früh-beginnender Parkinson-Krankheit (Polymeropoulos et al., 1997) ist es akzeptiert, dass der Phänotyp der Parkinson-Krankheit vererbt werden kann, im Fall dieser Mutation von α -Synuclein, autosomal dominant. ‚Linkage‘ Analysen haben mittlerweile weitere Gene und Genloci identifiziert, wie *parkin* (kodiert für das Protein Parkin), das Gen für die Thiol-Protease UCH-1, den Genlocus Park 3 und den 4p Haplotyp, mit dem Parkinson-Phänotypen verbunden sind und vererbt werden (siehe Dunnett und Björklund, 1999). Mit Ausnahme der *parkin*-Mutation weist die Neuropathologie aller Mutationen Lewy Körper auf. Da nur etwa 5 % der Parkinson Patienten an einer hereditären Form der Parkinson-Krankheit leiden, mit den beschriebenen

Mutation oder bisher unentdeckten, spielen möglicherweise Suszeptibilitätsgene, ähnlich wie bei der Alzheimer-Krankheit, eine wichtige Rolle als genetische Komponente bei der idiopathischen Parkinson-Krankheit. Wenige Fallstudien zeigen Polymorphismen in den Genen für Cytochrom P-450, N-Acetyltransferase 2 oder der Glutathion S-transferase, Enzyme, die mit intrazellulären Detoxifizierungsprozessen in Verbindung stehen, und möglicherweise die Vulnerabilität gegenüber Umweltgiften erhöht (siehe Schulz und Dichgans, 1999).

Synucleinopathien

Neben Ubiquitin und Neurofilamentproteinen enthalten die Lewy Körper bei der idiopathischen Parkinson-Krankheit α -Synuclein-Filamente in seiner Wildtyp-Form (Spillantini et al., 1997), was vermuten lässt, dass dieses Protein nicht nur bei der hereditären Form der Erkrankung sondern auch in der Pathogenese der sporadischen Parkinson-Krankheit eine wichtige Rolle spielt. α -Synuclein, ein hochkonserviertes Protein mit bislang unbekannter Funktion, wird im gesamten ZNS exprimiert und ist hauptsächlich in präsynaptischen Nervenendigungen lokalisiert (Maroteaux et al., 1988). Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass das Protein oder Fragmente davon auch Bestandteil der intraneuronalen filamentösen Einschlüsse sind, die bei der Alzheimer-Krankheit, der multiplen Systematrophie und der Demenz mit Lewy Körpern gefunden werden (Goedert et al., 1998), die aus diesem Grund auch als ‚Synucleinopathien‘ bezeichnet werden (Hardy und Gwinn-Hardy, 1998). Untersuchungen an transgenen Mäusen, die das humane Wildtyp-Protein überexprimieren, zeigen selektive intraneuronale nicht-filamentöse α -Synuclein-Akkumulation in der SNC, dem Neokortex und dem Hippokampus, die wiederum mit dem Verlust DAerger Terminalen im Striatum und motorischen Defiziten assoziiert sind (Masliah et al., 2000). Im Tierexperiment konnte bisher kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Neurotoxin-induzierten nigrostriatalen Degeneration und der Zunahme der α -Synuclein-Expression in DAergen Neuronen der SNC gezeigt werden (Kholodilov et al., 1999; Vila et al., 2000). Jedoch zeigen *in vitro* Studien, dass die Überexpression von α -Synuclein durch stabile Transfektion mitochondriale Dysfunktion (Hsu et al., 2000) und Zelltod (Saha et al., 2000) auslösen kann. Die Bedeutung von α -Synuclein und der Lewy Körper-Pathologie für die selektive Neurodegeneration bei der Parkinson-Krankheit ist bisher nicht bekannt. Nachdem nun aber gezeigt wurde, dass die chronische Behandlung mit Rotenon die Degeneration DAerger Neurone in der SNC auslöst, die mit der Bildung von fibrillären α -Synuclein-enthaltenden Lewy Körpern verbunden ist (Betarbet et al., 2000), scheint ein enger Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und der ‚Synucleinopathie‘ zu bestehen.

1.5.6. Sekundäre ‚extranigrale‘ Pathologie

Die neurodegenerativen Veränderungen der Parkinson-Krankheit bleiben nicht auf die Degeneration des mesostriatalen DA-Systems beschränkt. Zahlreiche neuropathologische Untersuchungen zeigen sehr selektive Verluste von Neuronen und Neuriten bzw. Lewy Körper und Lewy Neuriten in Teilen des limbischen Systems, wie limbischen Kortexregionen, der Amygdala und dem Hippokampus (Braak et al., 1996; Braak und Braak, 2000; Mattila et al., 1999) aber auch in Kernen des Hirnstamms, wie dem Locus coeruleus, den Kernen des Raphe Komplex und dem PPTg (Braak et al., 2000a; Hirsch et al., 1987;

Hurtig et al., 2000; Jellinger, 1991). Hierbei ist das Degenerationsmuster immer wieder sehr spezifisch, bilateral und betrifft ausschliesslich Projektionsneurone (Braak und Braak, 2000), was deutlich macht, dass sich die Pathoanatomie der Parkinson-Krankheit nicht auf die ‚nigrale Pathologie‘ beschränken lässt.

Die ‚extranigralen‘ Veränderungen definieren sich nicht nur in neuropathologischen *post mortem* Untersuchungen sondern ziehen weitreichende funktionelle Veränderungen in der Informationsverarbeitung nach sich und tragen somit zur komplexen Symptomatik der Parkinson-Krankheit bei. Neuere tierexperimentelle und humane Studien zeigen, dass eine Dysfunktion bzw. Degeneration des PPTg massgeblich an der Ausprägung der Akinese und des Rigors, als auch der Gang- und Haltungsstörungen, die Teil der Parkinson-Symptomatik sind, beteiligt ist (Zusammenfassungen in Delwaide et al., 2000; Munro-Davies et al., 1999; Pahapill und Lozano, 2000) (siehe auch 4.5). Schwere Schädigungen und das Auftreten von α -Synuclein-enthaltenden Lewy Körpern in limbischen Kortexregionen, dem Hippokampus und in Kernen der Amygdala korrelieren mit dem Auftreten von Demenzen, unter denen bis zu 90 % der Patienten leiden, und kognitiven Störungen, sowie emotionalen Veränderungen wie Depressionen, die etwa 40 % der Patienten betrifft (Braak et al., 1996; Hurtig et al., 2000; Mattila et al., 1999; Stocchi und Brusa, 2000).

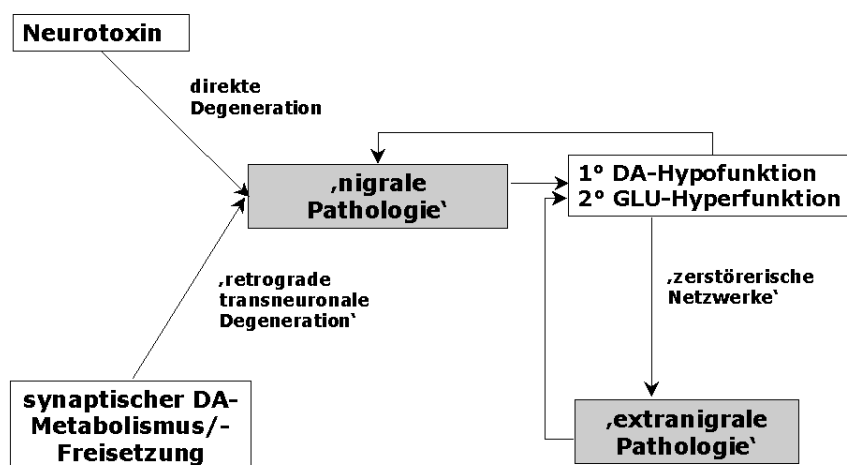


Abb. 10: Theorie des ‚zerstörerischen Netzwerke‘ für die Parkinson-Krankheit. Die primäre ‚nigrale‘ Degeneration wird induziert durch ein schädigendes Ereignis wie ein Neurotoxin (vermittelt über mitochondriale Dysfunktion, oxidativen Stress und ‚energie-gebundene Exzitotoxizität‘) entweder im Bereich der Somata (direkte Degeneration) oder auf Ebene der Synapsen (‚retrograde transneuronale Degeneration‘). Dies führt zur Exekution von Zelltodprozessen, die schliesslich zur distinkten ‚nigralen Pathologie‘ führen. Die primäre Dopamin-Unterfunktion hat eine Verschiebung der Transmitterbalancen in den unmittelbaren Projektionsgebieten und nachgeschalteter Strukturen zugunsten einer sekundären Glutamat-Überfunktion zur Folge. Dies wiederum stellt die treibende Kraft zur Progression der ‚nigralen Pathologie‘ dar und zusätzlich zur Entstehung der ‚extranigralen Pathologie‘ in distalen Gehirnregionen. DA, Dopamin, GLU, Glutamat (nach Pedersen und Schmidt, 2000a).

Die Pathogenese der ‚extranigralen Pathologie‘ ist bisher unbekannt, umfassende tierexperimentelle Studien in diesem Zusammenhang liegen derzeit nicht vor. Die

Ähnlichkeit zur ‚nigralen Pathologie‘ macht jedoch deutlich, dass wahrscheinlich vergleichbare neurodegenerative Prozesse, wie eine ‚langsame Exzitotoxizität‘ ursächlich an der ‚extranigralen Pathologie‘ beteiligt sind. Basierend auf den engen neuroanatomischen Verbindungen ‚extranigral‘ betroffener Strukturen mit den Kernen der Basalganglien (siehe 1.1.1.) kann davon ausgegangen werden, dass auch hier gestörte Transmitterbalancen vorliegen. Auch hier mag eine DA-Hypoaktivität eine sekundäre GLU-Hyperaktivität zur Folge haben und somit das gesamte Netzwerk der Basalganglien in ein ‚zerstörerisches Netzwerk‘ verwandelt (Abb. 10) (Pedersen und Schmidt, 2000a).

1.6. Induzierbare Transkriptionsfaktoren

Die Stimulation von Neuronen kann zwei verschiedene Mechanismen auslösen, mit denen Information verarbeitet und übertragen wird: (i) elektrophysiologische Aktivität, die eine unmittelbare Verarbeitung und Vermittlung von Information in Folge des Stimulus gewährleistet und (ii) die Veränderung der Genexpression, hervorgerufen durch das extrazelluläre Signal und vermittelt über intrazelluläre Signaltransduktionswege, die zu langfristigen Veränderungen neuronaler Funktionen führt. Die Genexpression wird durch Transkriptionsfaktoren (TFs) kontrolliert, die sequenzspezifisch im Promotorbereich eines Gens an *cis*-regulatorische Elemente der DNA binden und somit als Transkriptionsaktivator wirken. ‚Immediate early genes‘ (IEGs), aufgrund ihrer transformatorischen Eigenschaft auch als Protoonkogene bezeichnet, sind Gene, die sehr schnell in Folge eines extrazellulären Stimulus induziert werden und der zellulären Antwort vorausgehen, ohne dass dafür eine *de novo* Proteinsynthese nötig ist. Die IEGs, von denen im ZNS mittlerweile über 500 Gene kloniert sind, kodieren u.a. für induzierbare Transkriptionsfaktoren (iTfFs), die in der intrazellulären Signalkaskade als ‚third messenger‘ die Transkription verschiedenster Zielgene regulieren (Abb. 11). Die Stimulation metabotroper und ionotroper Neurotransmitterrezeptoren aktiviert die ‚second messenger‘ Signaltransduktion, die wiederum über Aktivierung konstitutiver TFs, wie das ‚cAMP responsive element binding protein‘ (CREB), mittels Phosphorylierung die Transkription der iTfFs induziert (Abb. 11) (Zusammenfassungen in Herdegen und Leah, 1998; Schulman und Hyman, 1999). Nach der Translation im Zytoplasma translozieren die iTfFs in den Kern und initiieren dort die Transkription ihrer entsprechenden Zielgene. *Trans*-aktivierende Regulationsmechanismen wie Phosphorylierung oder Oligomerisierung mit anderen iTfFs moduliert die DNA-bindenden Eigenschaften und Stabilität der iTfFs und damit ihre aktivierende aber auch reprimierende Eigenschaften (siehe Herdegen und Leah, 1998).

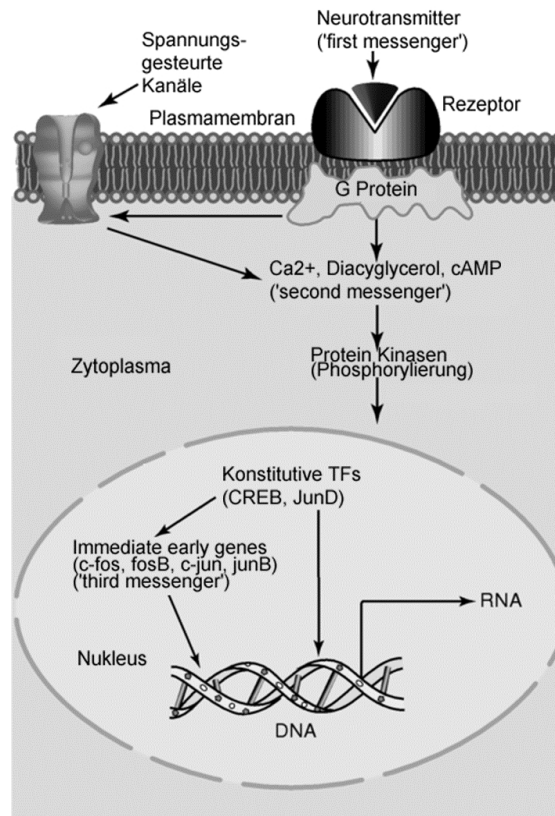


Abb. 11: Schematische und vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion in den Kern. Die Stimulation eines metabotropen Neurotransmitter-Rezeptors aktiviert über G-Proteine die intrazellulären Signalkaskaden und ‚second messenger‘ Systeme. Dies führt zu einer Ca²⁺-abhängigen Aktivierung von Proteinkinasen, die in den Kern translozieren und dort konstitutive Transkriptionsfaktoren (TFs) durch Phosphorylierung aktivieren. Die TFs regulieren die Induktion der ‚immediate early genes‘, deren Proteine als ‚third messenger‘ die Expression vielfältiger Zielgene aktiviert (aus Schulman und Hyman, 1999).

1.6.1. iTFs als anatomische Marker neuronaler Aktivierung

Zelluläre IEGs finden aufgrund ihrer Eigenschaft, sehr schnell und prominent nach einer neuronalen Stimulation induziert zu werden, breiten Einsatz als funktionelle neuroanatomische Marker. Dabei ist die Supergenfamilie der Aktivator Protein-1 (AP-1) TFs im ZNS mit am besten untersucht, da die Proteine dieser Familie wie c-Fos, FosB, c-Jun u.a., mit Ausnahme von JunD, unter basalen Bedingungen in nur sehr geringen Mengen im ZNS exprimiert werden, aber sensitiv auf Stimulation reagieren (siehe Gass und Herdegen, 1995; Herdegen et al., 1995).

iTFs und Dopamin-Glutamat Interaktion

Zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen zeigen, dass eine einmalige oder wiederholte DA D1-Rezeptor-Stimulation zu einer schnellen, transienten (c-Fos) bis anhaltenden (c-Jun) Induktion von iTFs insbesondere im Striatum führt. Auch in den Ausgangskernen der Basalganglien kann die systemische Gabe von DA D1-Rezeptor-Agonisten c-Fos induzieren. Korrespondierend induzieren DA D2-Rezeptor-Antagonisten selektive Expressionsmuster der AP-1 Proteine im dorsalen und ventralen Striatum (siehe (Herdegen und Leah, 1998). Diese D2-Antagonisten-vermittelte Induktion im Striatum ist abhängig von der GLUergen kortikostriatalen Projektion, was auf eine enge Interaktion zwischen der DA- und GLU-Transmission bei der Regulation der Aktivität der MSN im Striatum deutet (Berretta et al., 1992). Ebenso muss von einer komplexen Interaktion von striatalen DA D1- und D2-

Rezeptoren ausgegangen werden. Läsionen des mesostriatalen DA-Systems selbst induzieren GLU-abhängige anhaltende Expression von AP-1 Proteinen (siehe 4. 5.) und potenzieren selektiv die Wirkung von DA-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten im Striatum, STN, LGP und den Ausgangsstrukturen. Diese Befunde lassen vermuten dass die iTF-Induktion über Neurotransmitter wahrscheinlich immer an NMDA-Rezeptor-Aktivitäten gekoppelt sind. NMDA-Rezeptor-Agonisten selbst induzieren iTFs in einer Vielzahl von Gehirnregionen (siehe Herdegen und Leah, 1998).

Kinetik der iTF Expression

Generell ist eine wichtige Charakteristik der iTFs ihre schnelle Ein/Aus-Kinetik, mit Halbwertszeiten von 1 h nach Stimulation, jedoch können schädigende Ereignisse, wie Krampfanfälle oder die Durchtrennung von Nervenfasern (Axotomie) anhaltende (Monate bis Jahre) Expressionen von c-Fos und c-Jun induzieren. Dies wird im letzteren Fall mit einer anhaltenden zellulären Reaktion der geschädigten Neurone in Verbindung gebracht. Wiederholte identische oder kontinuierliche Stimulation scheint im Falle von c-Fos eine schnell Abregulation zu bewirken, FosB und dessen neu entdeckte Isoform Δ FosB dagegen akkumulieren regionspezifisch in Folge vieler möglicher chronischer Stimulationen (siehe Nestler et al., 1999). Aufgrund ihrer vielfältigen Beteiligung an intrazellulären adaptativen Prozessen ist die Dauer der iTF Aktivierung stark abhängig vom Zelltyp und der Art der Stimulation.

1.6.2. iTFs in Regeneration und Degeneration

Axotomie induziert eine komplexe Reaktion in den geschädigten Neuronen (Zellkörperreaktion), die umfassende morphologische und metabolische Veränderungen der Neurone bewirkt, die entweder zur Regeneration oder Degeneration des betroffenen Neurons führen. Hierbei scheint c-Jun gegenüber allen anderen iTFs eine Schlüsselrolle zu spielen. Persistierende Expressionen von c-Jun werden in zentralen und peripheren Neuronen nach Axotomie beobachtet, allerdings kann bislang kein einfacher Zusammenhang zwischen c-Jun Expression und Regeneration im Sinne von Axonwachstum hergestellt werden. Da c-Jun jedoch auch in Neuronen aufreguliert vorliegt, die degenerieren, scheint diesem iTF auch bei der Ausführung des neuronalen Zelltods eine wichtige Rolle zuzukommen. Zahlreiche experimentelle Evidenzen weisen auf wichtige Rollen von c-Fos und c-Jun bei der Degeneration und im apoptotischen Zelltod hin (siehe Herdegen und Leah, 1998). Darüberhinaus zeigen wenige humane *post mortem* Studien eine erhöhte Expression von c-Fos und c-Jun in Gehirnen von Alzheimer Patienten (Anderson et al., 1996; MacGibbon et al., 1997), was möglicherweise mit der chronischen Neurodegeneration assoziiert ist.

1.6.3. iTF regulierte Zielgene

Langfristige adaptative Veränderungen neuronaler Funktion durch iTFs wird durch die zelltypspezifische Regulation von Zielgenen erreicht. Zu den Proteinen, die eine AP-1 Erkennungssequenz in ihrem Promotor haben und damit spezifisch durch c-Fos und c-Jun reguliert werden können, zählen u.a. die Neuropeptide DYN und ENK, deren Expression im Striatum nach entsprechender Rezeptor-Stimulation der Induktion von c-Fos, c-Jun folgt. Weiterhin enthält der Promotor der TH eine AP-1 Konsensussequenz. Diese Regulation ist

jedoch in keinem Fall ausschliesslich, d.h. dass auch andere *cis*-aktive Elemente die Expression dieser Zielgene regulieren (siehe Herdegen und Leah, 1998). Auch Zytoskelettproteine wie Neurofilament oder das β -Amyloid-Vorläufer Protein weisen AP-1 Bindungsstellen in ihren Genpromotoren auf (Celsis, 2000; Trejo et al., 1994), was darauf hindeutet, dass deren physiologische Regulation unter dem Einfluss von iTFs steht und möglicherweise eine pathologisch bedingte chronische Induktion der AP-1 Proteine eine Dysregulation der Expression dieser Proteine bewirkt (siehe 1.5.5./1.5.6.).

1.7. Tiermodelle der Parkinson-Krankheit

Die gebräuchlichsten Tiermodelle der Parkinson-Krankheit stellen die wichtigsten motorischen Störungen wie Akinese und Rigor dar, weniger valide kann jedoch Tremor im Tier modelliert werden (ausführliche Darstellungen in Gerlach und Riederer, 1996; Kaakkola und Teravainen, 1990; Salamone et al., 1998). Die Induktion der Parkinson-Symptomatik erfolgt durch pharmakologischen Eingriff, der eine Unterfunktion der DA-Transmission insbesondere im dorsalen Striatum herstellt. Dies kann funktionell durch die reversible Blockade postsynaptischer DA-Rezeptoren erfolgen, oder durch irreversible Schädigung der präsynaptischen DAergen Terminalen bzw. Degeneration der mesostriatalen DA-Innervation. In allen Modellen kann die Wirksamkeit der herkömmlichen antiparkinsonoiden Therapien nachgewiesen werden. Selektiv finden sie Einsatz in der präklinischen Prüfung neuer Pharmakotherapien, aber auch alternativer Therapien wie der Behandlung mit Wachstumsfaktoren, dem viralen Gentransfer oder der Transplantation von embryonalen Stammzellen (siehe Dunnett und Björklund, 1999). Entsprechend den pathologischen, neurochemischen und verhaltenspharmakologischen Veränderungen besitzen die Modelle konstruktive oder ‚face‘ Validität hinsichtlich der Neurodegeneration bei der Parkinson-Krankheit, die spezifischen Effekte pharmakologischer Behandlungen verleiht ihnen prädiktive Validität bezüglich der antiparkinsonoiden Wirksamkeit der Substanzen.

1.7.1. Neuroleptika induzierte Katalepsie

Klassische Neuroleptika wie Haloperidol blockieren DA-Rezeptoren und induzieren beim Menschen wie im Versuchstier einen reversiblen Parkinsonismus, kennzeichnend für die extrapyramidalen Nebenwirkungen dieser Substanzen. Das Neuroleptika-behandelte Tier zeigt den Zustand der Katalepsie, der die Unfähigkeit definiert, sich aus einer extern auferlegten, unnatürlichen Körperhaltung zu befreien (Sanberg et al., 1988). Katalepsie reflektiert daher vor allem die Störung der Bewegungsinitiation und damit das Symptom Akinese. Neuroleptika behandelte Tiere zeigen weiterhin einen starken Rigor, der sich ebenfalls im Grad der Katalepsie äussert und eine allgemeine Abnahme der Spontanaktivität, als Anzeichen der inhibierten DA-Transmission (Schmidt, 2000). Dies ist ein akuter, reversibler Zustand, abhängig von den verwendeten DA-Rezeptor-Antagonisten. L-DOPA, DA-Rezeptor-Agonisten und NMDA-Rezeptor-Antagonisten können die Neuroleptika-induzierte Katalepsie antagonisieren (siehe Gerlach und Riederer, 1996; Schmidt et al., 1991; Schmidt und Kretschmer, 1997).

1.7.2. Reserpin Modell

Die systemische Gabe des *Rauwolfia* Alkaloid Reserpin verursacht bei der Ratte Akinese und Rigor, die durch die Gabe von L-DOPA abgeschwächt werden können (Carlsson et al., 1957).

Zusätzlich induziert die Reserpin-bedingte Entleerung DAerger Speichervesikel Tremor in der Ratte (Colpaert, 1987). Die systemische Gabe von Reserpin löst eine eher unspezifische Entleerung aller monoaminergen Speichervesikel (DA, NA, 5-HT) zentraler und peripherer neuronaler Terminalen aus, durch Inhibition des vesikulären Mg^{2+} -/ATP-abhängigen Monoamintransporters (Deutch und Roth, 1999). Dies führt wahrscheinlich zu einer irreversiblen Schädigung der Synapsen, so dass die Versuchstiere auch bei einmaliger Gabe noch nach mehreren Tagen Symptome zeigen (Colpaert, 1987). Im Tierversuch wird Reserpin in Kombination mit dem TH-Hemmer α -Methyl-*para*-tyrosin verabreicht und somit die DA-Freisetzung vollständig unterbunden. Auch in diesem Tiermodell zeigen L-DOPA, DA-Rezeptor-Agonisten und NMDA-Rezeptor-Antagonisten antikataleptische und antiakinetische Wirkung (siehe Gerlach und Riederer, 1996; Schmidt und Kretschmer, 1997).

1.7.3. MPTP-Modell

Die systemische Gabe von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) induziert bei Primaten (Burns et al., 1983) und im Menschen (Langston et al., 1983) schwere, irreversible Parkinson-Symptome, die verbunden sind mit pathologischen neurochemischen und biochemischen Veränderungen, die denen der Parkinson-Krankheit sehr ähnlich sind. Die Symptome können durch die Gabe von L-DOPA und DA-Rezeptor-Agonisten antagonisiert werden (Zusammenfassung in Gerlach und Riederer, 1996). Die MPTP-Toxizität prägt sich unterschiedlich stark in den verschiedenen Tierspezies aus, wobei Affen die grösste Sensitivität zeigen, ähnlich Mäuse, Ratten jedoch relative resistent gegenüber der Toxinwirkung sind (Gerlach und Riederer, 1996; Kaakkola und Teravainen, 1990). Dies erklärt sich durch den pathobiochemischen Mechanismus der MPTP-Toxizität. MPTP passiert nach systemischer Gabe die Blut-Hirn-Schranke und wird wahrscheinlich in der Glia durch die MAO-B zum 1-Methyl-4-phenylpyridinium Ion (MPP^+) oxidiert, dem eigentlichen Toxin. MPP^+ wird selektiv über den DAT in die DAergen Axonterminalen aufgenommen und induziert degenerative Prozesse, die derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Wahrscheinlich schädigt MPP^+ die Neurone durch Inhibition der mitochondrialen Atmungskette, möglicherweise von Komplex I und induziert somit ein Energiedefizit. Weiterhin wird vermutet, dass hierbei freie Radikale entstehen, die die Neurone zusätzlich vulnerabel gegenüber GLU-vermittelten neurotoxischen Prozessen macht (Zusammenfassungen in Gerlach und Riederer, 1996; Tipton und Singer, 1993). Lokale intrazerebrale Injektion vom MPP^+ in die SNC kann auch bei der Ratte (die nur wenig MAO-B im ZNS exprimiert und somit MPTP nicht konvertiert werden kann) die entsprechenden pathologischen Veränderungen hervorrufen. Im Affen löst MPTP je nach Dosierungsschema Hypokinese, Rigor, Haltungstremor und eine Abnahme der Spontanaktivität aus, die Quantifizierung der Verhaltensdefizite erfolgt nach einem modifizierten Parkinson-Schema. Die MPTP-induzierten Verhaltensdefizite in der Maus umfassen Akinese und Katalepsie, die jedoch reversibel sind (Kaakkola und Teravainen, 1990). In beiden Tierspezies wird ein selektiver schwerer Verlust DAerger Neurone in der SNC und eine damit korrelierende Abnahme des striatalen DA-Gehalts (bis zu 99 % im Primaten) nachgewiesen. ‚Extranigrale Pathologie‘, wie Neurodegeneration im Locus coeruleus werden beim Affen ebenfalls beobachtet (siehe Gerlach und Riederer, 1996). Hemiparkinson-Modelle können durch Injektion von MPTP in die Karotisarterien erzeugt werden (Kaakkola und Teravainen, 1990). Das MPTP-Modell im Affen findet weite Anwendung zur Untersuchung neuer DAerger

Therapien, da auch die L-DOPA-induzierten Dyskinesien in diesem Modell nachgestellt werden können (siehe 5.1.), aber auch anti-GLUerger und neuroprotektiver Strategien (Zusammenfassung in Gerlach und Riederer, 1996). Unter dem ätiopathologischen Aspekt stellt das MPTP-Modell am ehesten ein Modell für akute oder chronische Intoxikation von Umweltgiften dar.

1.7.4. 6-Hydroxydopamin-Modell

Das Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) zertört selektiv katecholaminerge Neurone des zentralen und peripheren Nervensystems. Intrazerebrale Injektion, 6-OHDA passiert nicht die Blut-Hirn-Schranke, induziert eine selektive Degeneration DAerger und NAerger Neurone mit korrespondierenden Verlusten der DAergen und NAerger Innervation (Ungerstedt, 1968; Uretsky und Iversen, 1970). Die bilaterale lokale Injektion von 6-OHDA in die SNC der Ratte verursacht massive Hypokinese, schwere Aphagie und Adipsie (Ungerstedt, 1971a), die durch die Gabe von L-DOPA und DA-Rezeptor-Agonisten aufgehoben werden können (siehe Kaakkola und Teravainen, 1990). Die unilaterale Injektionen in die SNC oder das aufsteigende MFB vermeidet diese schweren Verhaltensstörungen. Allerdings zeigen sich Läsions-bedingte Verhaltensdefizite auch nicht spontan sondern nur durch die akute Behandlung mit DA-Rezeptor-Agonisten wie Apomorphin oder Amphetamin in kontralateralem bzw. ipsilateralen Rotationsverhalten und (Ungerstedt, 1971b). Anhand dieses Rotationsverhaltens, das durch die Supersensitivität striataler DA-Rezeptoren im denervierten Striatum erklärt wird (Ungerstedt, 1971b), kann der prä- oder postsynaptische Wirkort und auch das antiparkinsonoide Potential einer Substanz erfasst werden, jedoch reflektiert dieses Modell, auch wenn es weiten Einsatz findet, die neuropathologischen Veränderungen der Parkinson-Krankheit nur teilweise (siehe Schwarting und Huston, 1996).

Die Toxinwirkung von 6-OHDA beruht wahrscheinlich auf der Inhibition des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Glinka et al., 1996), weiterhin entstehen bei dessen intraneuronalen enzymatischen Abbau und Autoxidation freie Radikale (Heikkila und Cohen, 1972), die zur Degeneration der DAergen Neurone beitragen (siehe 1.5.2). Die Selektivität von 6-OHDA für katecholaminerge Neurone wird durch dessen Aufnahme über den hochaffinen Monoamintransporter definiert. Die Spezifität für das DA-System im Tierversuch wird durch die reversible Inhibition des NA-Transporters (z.B. Desipramin) erreicht (Breese und Traylor, 1971).

Die intrastriale Injektion von 6-OHDA verursacht eine langsame retrograde transneuronalen Degeneration der SNC mit einem entsprechende Verlust der DAergen Innervation im Striatum (siehe 4.1.) (Kirik et al., 1998; Sauer und Oertel, 1994). Auch hier können Verhaltensdefizite nur durch die Stimulation supersensitiver DA-Rezeptoren deutlich gemacht werden. Dieses Modell bietet jedoch den Vorteil gegenüber der direkten 6-OHDA Läsion, dass die Degeneration langsam und graduelle verläuft, somit findet es Einsatz insbesondere bei der Untersuchung restorativer Sstrategien, wie der Behandlung mit Wachstumsfaktoren, dem viralen Gentransfer oder der Transplantation embryonalen Gewebes bzw. Stammzellen (Dunnett und Björklund, 1999; Kirik et al., 2000; Rosenblad et al., 1999; Rosenblad et al., 2000b; Rosenblad et al., 2000a).

Unter dem Aspekt der Ätiopathologie reflektiert dieses Modell die Hypothese, dass freigesetztes DA (Hastings et al., 1996) oder auch endogenes 6-OHDA, das im Gehirn von

Parkinson Patienten nachgewiesen wurde (Glinka et al., 1996) im Bereich der Terminalen mitochondriale Dysfunktion und oxidativen Stress verursachen kann (siehe 1.5.2) und somit einen retrograden transneuronalen Degenerationsprozess auslöst (1.5.4.) (Hastings und Zigmond, 1997).

2. Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit verhaltenspharmakologischen, neurochemischen, biochemischen und histologischen Methoden, ein Tiermodell der Parkinson-Krankheit zu charakterisieren und den Einfluss des DAergen und GLUergen Transmittersystems auf die ‚primären‘ und ‚sekundären‘ Degenerationsprozesse zu beurteilen.

1. Ausgehend davon, dass die Degeneration des DAergen Transmittersystems bei der Parkinson-Krankheit ein gradueller Prozess ist, der im Verlaufe zu einer zunehmenden Imbalance zwischen DAerger und GLUerger Transmission in den Basalganglien führt, soll ein Tiermodell eingesetzt werden, in dem die langsame progrediente DAerge Degeneration simuliert wird. In den gängigen Tiermodellen der Maus, der Ratte und dem Affen werden meist unilaterale, schwere bis komplette Läsionen erzeugt, die terminale Stadien der Erkrankung darstellen und daher keine Aussage über die frühen pathologischen Veränderungen in Folge der DA-Denervation zulassen. Daher soll hier eine partielle striatonigrale Degeneration erzeugt werden, die sowohl die Verhaltensdefizite als auch die Neuropathologie der frühen klinischen Parkinson-Krankheit reflektiert. Gemäss der Hypothese, dass der sekundären ‚extranigralen‘ Pathologie eine chronische DA-Hypofunktion und GLU-Hyperfunktion in Gehirnregionen distal der primären Degeneration zugrunde liegt, soll die striatonigrale Degeneration bilateral erfolgen, um kompensatorische Effekte der intakten DAergen Innervation auf die sekundären Prozesse auszuschliessen. Die spezifischen Verhaltensdefizite wie Akinese, Rigor und verminderte Spontanaktivität, die durch die ‚primäre‘ Degeneration des DAergen Systems ausgelöst werden, sollen charakterisiert und mittels *post mortem* Analysen neurochemisch und histologisch verifiziert werden. Da angenommen wird, dass die ‚extranigrale‘ Pathologie zunächst durch eine veränderte neuronale Aktivität und Funktion ausgelöst wird, bevor sie sich in einer Degeneration manifestiert, sollen im Tiermodell über den Nachweis von iTFs die Strukturen aufgezeigt werden, die besonders vulnerabel für diese sekundären Prozesse sind. Diese Ergebnisse sollen Rückschlüsse auf die -basierend auf der funktionellen neuroanatomischen Verschaltung der Basalganglien und deren eng assoziierten Strukturen- postulierten Transmitterimbancen ermöglichen und zeigen, ob die so induzierte ‚extranigrale‘ Pathologie mit der Parkinson-Krankheit vergleichbar ist.

2. Im nächsten Schritt soll untersucht werden, ob die Wiederherstellung des DAergen Tonus zu einem frühen Zeitpunkt der striatonigralen Degeneration mit den direkten DA D2-Rezeptor-Agonisten Cabergolin und Lisurid die beobachtete primäre Degeneration und sekundären Veränderungen beeinflussen kann und dadurch möglicherweise eine neuroprotektive Wirkung hat. Unter dem Gesichtspunkt, dass die Pharmakokinetik der DA-Substitution das Risiko zur Entwicklung von motorischen Komplikationen wie Dyskinesien festlegt, soll untersucht werden, ob die chronische Behandlung mit den beiden DA-Agonisten zur Sensitivierung der motorischen Verhaltensantwort führt bzw. dies verhindert und dies wiederum mit adaptativen Veränderungen der neuronalen Funktion im Striatum verbunden ist. Die Ergebnisse sollen zeigen, ob das hier eingesetzte Tiermodell auch für die Entwicklung der LIDs bei der Parkinson-Krankheit eine prädiktive Validität hat.

3. Unter der Annahme, dass die progressive Degeneration der SNC durch eine langsame ‚energie-gebundene‘ Exzitotoxizität angetrieben wird, soll in einem weiteren Experiment die

Wirkung einer chronischen Hemmung des überaktiven GLUergen Systems auf den Verlauf und die Ausprägung der primären Degeneration nach DA-Denervation untersucht werden. Die selektive Inhibition der NMDA-Rezeptoren mit CP-101,606 erfolgt über die Polyaminbindungsstelle der NR2B-SU, was zu einer ‚aktivitäts-abhängigen‘ Blockade spezifisch in den Regionen führt, in denen die GLUerge Transmission überaktiv ist. Die Untersuchung soll darüberhinaus die Hypothese überprüfen, ob eine sekundäre GLU-Hyperaktivität in neuroadaptive Prozesse in ‚extranigralen‘ Strukturen involviert ist. Dies soll die Möglichkeit aufzeigen, dass eine anti-GLUerge Therapie der Parkinson-Krankheit nicht nur unter dem Gesichtspunkt der unmittelbaren symptomatischen Behandlung attraktiv ist, sondern auch unter dem Aspekt, dass dadurch die umfassende Funktionsveränderung und Degeneration motorischer und kognitiver Systeme verzögert werden kann.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere und Haltung

Die Versuche wurden mit insgesamt 160 männlichen adulten Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt, die zu Beginn der Experimente ein Gewicht von 200 -240 g aufwiesen. Die Tiere wurden in Gruppen von 6 bis 8 Tieren in Standard Makrolon-Käfigen (56. cm x 35 cm x 19 cm) bei einer Temperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 40 - 60 % in einem zwölfstündigen Licht-Dunkelwechsel (Lichtphase: 06⁰⁰-18⁰⁰) gehalten. Jedes Tier erhielt 12 g Trockenfutter/Tag (Altromin, Lage, Deutschland), Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

3.2. Stereotaktische 6-OHDA Injektionen

30 Minuten vor Beginn der Operation wurden die Tiere mit 20 mg/kg Desipramin HCl intraperitoneal (i.p.) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) vorbehandelt, um die präsynaptische Aufnahme von 6-OHDA in noradren (NA)erge Terminalen zu reduzieren (Breese und Traylor, 1971) und somit die 6-OHDA Wirkung auf DAerge Neurone zu beschränken (Carter und Pycock, 1980). Die Tiere wurden mit 60 mg/kg Pentobarbital-Na i.p. (Narcoren[®], Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) narkotisiert und präoperativ mit 0.2 mg Atropinsulfat subkutan (s.c.) (Serva, Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland) behandelt, um die Speichel- und Schleimsekretion in die Lunge zu vermindern. Bei ausreichender Narkosetiefe wurden die Tiere in einen stereotaktischen Apparat eingespannt (Trent Wells Inc., SO Gate, CA, bzw. Stoelting Co. Wood Dale, IL), nach Freilegen des Schädelknochens und Trepanation wurde je 1 µl 6-OHDA (7 µg bzw. 10 µg/µl, berechnet als freie Base, frisch gelöst in 0.1% Ascorbat/0.9% NaCl, Sigma Chemicals, St. Louis, MO) stereotaktisch an 4 Läsionsorten injiziert. 6-OHDA wurde mit einer Mikroliterspritze (Aussendurchmesser 0.63 mm, SGE, International Pty. Ltd., Australien) mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 0.25 µl/min an folgenden Koordinaten nach Paxinos & Watson (Paxinos und Watson, 1997) in das dorsale Striatum infundiert: anterior-posterior (AP): 0.5/-0.4 mm, lateral: ±2.8/±3.4 mm, dorsoventral: -5.0/-4.8 mm [relativ zu Bregma] mit einer Zahnbalkenstellung von 3.3 mm unter der Interaurallinie. Um die Diffusion des Toxins in das umliegende Parenchym zu gewährleisten, wurde die Mikroliterspritze erst 1 min nach der Injektion langsam entfernt. Die Bohrlöcher wurden mit Knochenwachs verschlossen, nach präventiver antibiotischer Behandlung des Schädelknochens mit Nebacetin[®]-Puder (Yamanouchi Pharma GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde die Kopfhaut vernäht und abschliessend die Wunde mit Nobecutan[®] Sprühverband (Astra GmbH, Wedel, Deutschland) verschlossen. Kontrolltieren wurde das entsprechende Volumen Vehikel (0.1% Ascorbat/0.9% NaCl) unter identischen Operationsbedingungen infundiert.

3.3 Subkutane Implantation von miniosmotischen Pumpen

Zur s.c. Implantation von steril gefüllten ALZET (ALZA Corporation, Palo Alto, CA) miniosmotischen Pumpen (2ML2, Pumprate 5µl/h, über 21 Tage) wurden die Ratten mit 50 mg/kg Narcoren[®] narkotisiert. Durch einen mediolateralen Hautschnitt zwischen den

Schulterblättern wurde durch das Einführen und Aufspreizen einer Pinzette nach kaudal eine subkutane Tasche erzeugt, in die die vorinkubierte (in steriler Saline, 4 h bei 37°C) Pumpe eingeführt wurde. Die Hautwunde wurde vernäht und die Tiere erwachten kurze Zeit nach Beendigung aus der Narkose.

3.4. Substanzen

Alle systemischen Substanzapplikationen erfolgten i.p. oder s.c. mit einem Injektionsvolumen von 1ml/kg Körpergewicht.

3.4.1. Dopamin D2-Rezeptor-Agonisten

Apomorphin

Eine gebrauchsfertige Injektionslösung Apomorphin (Woelm Pharma, Deutschland) wurde täglich frisch in *aqua ad injectabile (a.a.i.)* verdünnt und für die Dauer des Experiments lichtgeschützt aufbewahrt. Apomorphin wurde 15 min vor den Experimenten s.c. injiziert.

Cabergolin

Cabergolin (1-Ethyl-3 (3'-dimethylaminopropyl)-3-(6'-allylergoline-8'-beta-carbonyl)-urea) (Pharmacia & Upjohn, Mailand, Italien) wurde in 0.1 M Phosphorsäure gelöst (4.5 mg/0.2 ml), mit Saline auf die Endkonzentration verdünnt und lichtgeschützt aufbewahrt.

Lisurid

Lisuride (N-(D-6-methyl-8-isoergolenyl)-N',N'-diethylcarbamid hydrogenmaleat) (Schering AG Berlin, Germany) wurde in Saline gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt.

3.4.2. Dopamin D2-Rezeptor-Antagonisten

Haloperidol

Eine gebrauchsfertige Injektionslösung Haloperidol (Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) wurde mit Saline verdünnt und 30 min vor dem Experiment i.p. injiziert.

3.4.3. NMDA-Rezeptor-Antagonist

CP-101,606

CP-101,606 ((1S,2S)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-hydroxy-4-phenylpiperidino)-1-propanol) (Pfizer Inc. Groton, CT) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Chemicals, St. Louis, MO) gelöst, mit dem gleichen Volumen *a.a.i.* verdünnt, in miniosmotische Pumpen gefüllt und durch s.c. Implantation der Pumpen chronisch appliziert. Unmittelbar vor der Pumpenimplantation wurden die Tiere einmalig mit einer Initialdosis i.p. behandelt.

3.5. Verhaltensexperimente

Die Verhaltensexperimente wurden zu Beginn der Lichtphase zwischen 08⁰⁰ und 13⁰⁰, frühestens 8 Tage nach den operativen Eingriffen, durchgeführt.

3.5.1. Katalepsie

Das Ausmass der Katalepsie wurde in einem zweiteiligen Verhaltenstest (modifiziert nach (Scheel-Krüger, 1983) in angegebener Reihenfolge quantifiziert:

‚horizontale Stange‘: beide Vorderpfoten der Ratte wurden auf eine Stange (9 cm über der Unterlage) plaziert.

‚vertikales Gitter‘: die Ratte wurde mit allen vier Pfoten an ein vertikales Gitter mit einer Gitterweite von 1 cm gehängt.

Als Abstiegslatenz wurde das Zeitintervall von der Positionierung der Ratte bis zur ersten Bewegung einer Pfote gemessen, mit einer maximalen Latenzzeit von 180 sek.

3.5.2. Lokomotion

‚open field‘ mit ‚holeboard‘

Veränderungen der spontanen und substanz-induzierten lokomotorischen und explorativen Aktivität wurden in einem, von der Umgebung abgeschlossenen, belüfteten Versuchsfeld (69 x 69 cm, beleuchtet durch 4 x 25 W Rotlichtbirnen) mit einem ‚holeboard‘ (unterteilt in 5 x 5 Felder mit je einem Loch in der Mitte, Durchmesser 4cm, 4 cm über der Feldoberfläche) quantifiziert. Über einen Zeitraum von 5 min wurden folgende Verhaltensparameter mit Hilfe einer Videokamera aufgezeichnet, und anschliessend ‚off-line‘, computergestützt analysiert:

Felderwechsel (Anzahl)

Dauer des aktives und inaktives Sitzens [sek] ohne Felderwechsel (Immobilität)

Aufrichten (Anzahl) an den Wänden des Versuchsfeldes (‚rearing‘)

Eintauchen (Anzahl) des Kopfes in die Löcher (‚head dips‘)

Aktivitätsbox

Die automatisierte Analyse der Veränderungen der spontanen lokomotorischen und explorativen Aktivität wurde in einer von der Umgebung abgeschlossenen Experimentierkammer (47 x 47 x 44 cm) durchgeführt, in der die Aktivität des Tieres durch Lichtschranken in drei Ebenen (x, y, z₁) gemessen werden kann (ActiMot, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland). In einem Zeitraum von 20 min wurden die Dauer (sek) der Inaktivität und Aktivität, die zurückgelegte Wegstrecke (m), die Anzahl des Aufrichtens in z₁, sowie die Anzahl der Drehungen um die dorsoventrale Körperachse computergestützt (Moti4, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) ermittelt.

3.5.3. Schnüffelstereotypie

Das spontane und substanz-induzierte Schnüffelverhalten wurde in einer Experimentierkammer aus Plexiglas (Schnüffelbox, 30 x 10 x 10 cm) durchgeführt (Schmidt, 1986), über einen Zeitraum von 5 min mit einer Videokamera dokumentiert, ‚off-line‘ wurden folgende Verhaltensparameter computergestützt quantifiziert:

Schnauzen-Wand-Kontakte (Anzahl)

180° Drehungen um die dorsoventrale Körperachse (Anzahl)

Dauer der Inaktivität [sek]

Die Anzahl der Schnauzen-Wand-Kontakte war ein Mass für die Schnüffelaktivität

3.6. Neurochemie

3.6.1 Gewebepreparation

Die Tiere wurden dekapitiert und die herauspräparierten Gehirne für 1 min in eiskalter Saline gekühlt. Die Gehirne wurden in einem gekühlten Aluminium-Schneideblock mit

Mikrotom-Klingen in 1.5 mm dicke horizontale Schnitte gechnitten (Heffner et al., 1980), die relevanten Vorderregionen (medialer präfrontaler Kortex, PFC; rostraler und kaudaler Nucleus caudatus / Putamen, rCPu und cCpu; Nucleus accumbens, Acb) mit Mikroskalpellen auf einer gekühlten Aluminiumplatte präpariert (Abb. 12) und bis zur weiteren Analyse in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

3.6.2. Probenaufarbeitung

Die gefrorenen Gewebeproben wurden in eiskalter HPLC mobiler Phase (35 mM Citrat H₂O, 50 mM Natrium-Acetat, 0.13 mM Na₂-EDTA, 0.45 mM 1-Octansulfonat, 10% MetOH, pH 3.8) mit Dihydroxybenzylamine (DHBA, Sigma Chemicals, St. Louis, MO) als internem Standard homogenisiert und für 30 sek bei 12,500 g zentrifugiert. 19.5 µl des filtrierten Überstandes (0.2 µm, Teflon-Spritzenfilter, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) wurden mit Hilfe eines gekühlten (4°C) automatischen Probenaufgebers (CMA 200, CMA Microdialysis, Schweden) in das Chromatographiesystem injiziert (Kilpatrick et al., 1986).

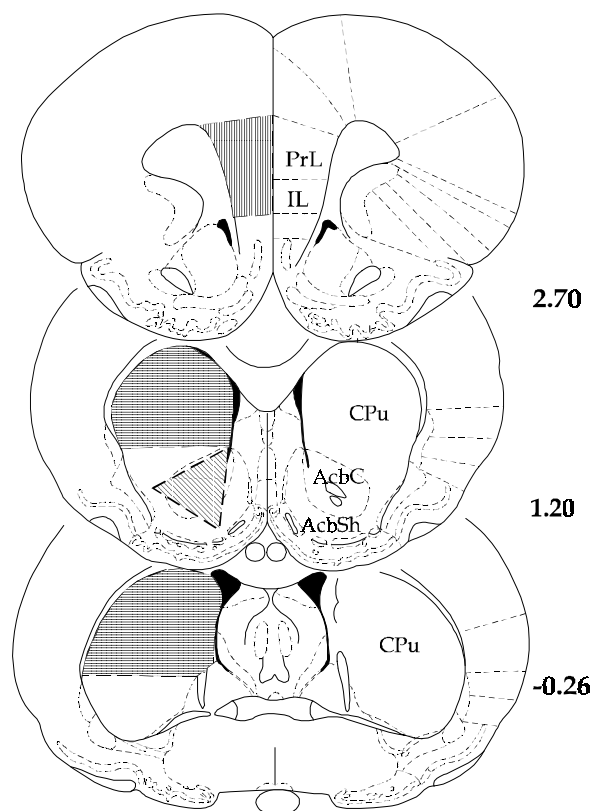


Abb. 12: Schematische Darstellung der koronaren Schnitte (AP [mm] relativ zu Bregma nach Paxinos und Watson, 1997) und der daraus präparierten Vorderhirnregionen. Acbc, Nucleus accumbens core Region; Acbsh, Nucleus accumbens shell Region; CPu, Nucleus caudatus/Putamen; IL, Cortex infralimbicus; PrL, Cortex prelimbic.

3.6.3. HPLC-Analyse

Der Gewebegehalt der biogenen Amine (Dopamin, DA; Noradrenaline, NA; Serotonin, 5-HT) sowie deren Metaboliten (Dihydroxyphenylethylsäure, DOPAC; Homovanillinsäure, HVA; 5-Hydroxyindolessigsäure, 5-HIAA) wurde durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion (HPLC-ECD)

bestimmt (ausführliche Darstellung der verwendeten Analytik in (Bubser, 1992). Nach Oxidation der mobilen Phase an einer ‚guard cell‘ (ESA 5020) bei einem Potential von 450 mV, erfolgte die Trennung der biogenen Amine über eine ‚reversed phase‘-Säule (Spherisorb ODS II, 3.0 mm x 125 mm, 5 µm Porengrösse, Bischoff, Leonberg). Die mobile Phase wurde mit einer konstanten Flussrate von 0.8 ml/min bereitgestellt (ESA 2200 analytische Pumpe, Bischoff, Leonberg). Die oxidierten (Elektrode 1: E = +20 mV, Elektrode 2: E = +320 mV) biogenen Amine wurden coulometrisch an einer porösen Graphitelektrode (ESA 5011 Analysenzelle) detektiert.

3.6.4. Datenauswertung

Die Chromatogramme wurden mittels eines Chromatographiedatensystems (Axxiom 727, Sykam, Gilching, Deutschland) ausgewertet. Die Peakzuordnung erfolgte über den Vergleich mit den Retentionszeiten von Referenzsubstanzen. Die Konzentration der biogenen Amine wurde nach der Internen-Standard-Methode durch Integration der Peakflächen als Substanzmenge pro Frischgewicht [pg/mg] berechnet.

3.7. Dopamin Rezeptor Bindungsassay

Die Bestimmung der Anzahl striataler DA D1- (modifiziert nach Cheetham et al., 1995 und D2-Rezeptoren Köhler et al., 1985) sowie deren Dissoziationskonstanten als Mass für die Ligandenaffinität wurde mittels eines Rezeptorsättigung-Bindungsassay durchgeführt.

3.7.1. Probenaufarbeitung

Das gefrorene Gewebe (siehe 3.6.1) wurde 1:100 (w/V) in eiskaltem 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 in einem Glas-Teflon Potter homogenisiert und für 10 min, 4°C, bei 30,000g zentrifugiert. Nach zweimaligem Wiederholen des Waschschrutes wurde das erhaltene Pellet 1:50 (w/V) in 50mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2mM CaCl, 1 mM MgCl, pH 7.4 resuspendiert.

3.7.2. Bindungsassay

Das gewaschene Gewebshomogenat wurde zweifach bzw. dreifach in einer ansteigenden Konzentrationsreihe tritium^[3H]-markierter Liganden (NEN Life Science Products Inc., Boston, MA) (D1: 0.1 – 10.0 nM ^[3H]SCH23390, 70.3 Ci/mmol; D2: 0.5 – 75.0 nM ^[3H]Racloprid, 79.3 Ci/mmol) mit oder ohne den jeweiligen nicht-radioaktiven Substanzen [D1-Rezeptoren: 100 nM R(+) SCH23390-hydrochlorid (RBI, Natick, MA, U.S.A.); D2-Rezeptoren: 100 µM S(-)-Racloprid-L-tartrat (RBI, Natick, MA)] für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Bindungsreaktion wurde durch rasches Filtrieren des Ansatzes durch ein GF/B Glasfaser Filter (Whatman, Kent, U.K.) und Waschen mit eiskaltem 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, beendet. Die an das Filterpapier gebundene Radioaktivität wurde mittels Flüssigszintillation in einem Beta Counter (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) quantifiziert. Die Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), mit Rinderserumalbumin als Standard, bestimmt.

3.7.3. Datenauswertung

Die spezifische Ligandenbindung wurde definiert aus der Differenz der gebundene Radioaktivität in Anwesenheit oder Abwesenheit der nicht-radioaktiven Substanzen. Die Werte für die Equilibriums-Dissoziationskonstante (K_d) als Mass für die Affinität [nM] und die maximale Anzahl der Bindungsstellen (B_{max}) pro Frischgewicht [nM/mg Protein]

wurden durch eine nicht-lineare Regressionsanalyse mit Hilfe des LIGAND Programms (Munson und Rodbard, 1980) berechnet.

3.8. Histologische Färbungen

3.8.1. Gewebspräparation und -fixierung

Natives Gewebe

Die Tiere wurden dekapitiert und die herauspräparierten Gehirne für 1 min in eiskalter Saline gekühlt. Die Mittelhirne wurden auf Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Immersionsfixierung

Nach Dekapitierung wurden die herauspräparierten Gehirne für 1 min in eiskalter Saline gekühlt. Die Mittelhirne wurden für 48 h bei Raumtemperatur (RT) in 4% Paraformaldehyd (PFA), 0.1 M Phosphatpuffer (PB), pH 7.4 immersionsfixiert, in 30% Sucrose, 0.1 M PB bei 4°C bis zum Absinken kryogeschützt, anschliessend auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Perfusionsfixierung

Zur transkardialen Perfusionsfixierung wurden die Tiere mit 50 I.E. Heparin (Vetren[®] 200, Byk Gulden, Konstanz, Deutschland) und 0.1 ml einer 1% Na-Azid Lösung i.p. vorbehandelt und unter tiefer Narkose (65 mg/kg Narcoren[®]) über die aufsteigende Aorta mit 50 ml 0.9 % NaCl, RT, gefolgt von 350 ml 4% PFA, 0.1 M PB, pH 7.4, (RT) perfundiert. Die herauspräparierten Gehirne wurden für 2 h bei 4°C in PFA nachfixiert, 48 h in 0.2 M PB, pH 7.4, 4°C gespült, in 30 % Sucrose, 0.1 M PB, pH 7.4, 4°C bis zum Absinken kryogeschützt und abschliessend auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.8.2. Gewebeaufarbeitung

Für anschliessende histologische und immunhistologische Färbungen wurden die Gehirne mit einem Kryostaten (Leica, Bensheim, Deutschland) in koronar Schnitte von jeweils 4-6 Serien geschnitten. Die Schnitte (16 μm Dicke) der nativen, frischgefrorenen Mittelhirne wurden direkt auf geladene Objektträger aufgebracht und bis zur Färbung bei -80°C gelagert. Die Schnitte (40 – 50 μm Dicke) der fixierten Gehirne wurden in 0.05 M Tris-gespufferter Saline (TBS), pH 7.6 aufgefangen und bis zur Färbung unter Zusatz von 0.1 % Na-Azid bei 4°C gelagert.

3.8.3. Histochemische Färbungen

Nisslfärbung mit Thionin

Zur Färbung der Nisslsubstanz wurden die fixierten Schnitte auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und über Nacht (üN) in 1-Propanol:EthOH (1:1), bei RT entfettet. Nach Rehydrierung (je 5 min 2*100 %, 96 %, 90 %, 70%, 50 % EtOH, dH₂O) wurden die Schnitte für 15 – 40 sek. in Thionin (4.35 mM Thionin, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, 100mM Eissigsäure, 36 mM NaOH) gefärbt, anschliessend der überschüssige Farbstoff unter fliessendem dH₂O ausgespült, dehydriert, in 96% EtOH + Essigsäure (wenige Spritzer

Eisessig auf 200 ml) für 1-4 min differenziert, geklärt in Xylol (je 15 min α -Trepineol:Xylol, 1:1, 2* Xylol, 1 h Xylol) und in Entellan[®] (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

3.8.4. Immunhistochemie

Avidin-Biotin-Methode

Die immunhistochemischen Färbungen zum lichtmikroskopischen Nachweis von verschiedenen Antigenen wurden an fixierten Gehirnschnitten ‚free-floating‘ nach der Avidin-Biotin Methode durchgeführt. Die Schnitte wurden 3*10 min in 0.05 M TBS, pH 7.6 gewaschen und für 20 min, RT, in 50 % EtOH, 1 % H₂O₂ permeabilisiert. Nach 1 h Inkubation bei RT in 12 % normalem Ziegen- (NGS) bzw. Pferdeserum (NHS) (Vector Laboratories, CA), in 0.05 M TBS, pH 7.6 mit 0.5 % Triton X-100 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) (TBST), wurden die Schnitte für 16–48 h mit den jeweiligen Primärantikörpern (siehe Tabelle 1), verdünnt in 2 % NGS bzw. NHS, TBST, bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden nacheinander für jeweils 1 h bei RT mit biotinyliertem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG bzw. Pferd-anti-Maus IgG, Vector Laboratories, CA, verdünnt 1:200 in 2 % NGS/NHS, TBST) und Avidin-biotinylierte Meerrettichperoxidase Komplex (Vector Laboratories, CA, verdünnt 1:500 in TBST) inkubiert. Jeder Inkubationsschritt wurde unter leichter Bewegung durchgeführt und durch jeweils 3*10 min Waschen bei RT in TBST beendet. Abschliessend wurden die Schnitte für 10 min, RT mit 0.06 % 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) gelöst in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, vorinkubiert und die Immunreaktion durch Zugabe von 0.015 % H₂O₂ sichtbar gemacht. Die Reaktion wurde durch 3*10 min Waschen in 0.05 M TBS, pH 7.6 beendet. Die Schnitte wurden auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet, dehydriert, in Xylol geklärt und in Entellan[®] eingedeckelt.

Die Spezifität der Immunreaktion wurde an Kontrollschnitten nachgewiesen, die ohne den Primär- bzw. biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert wurden, wobei keine Immunreaktion (IR) sichtbar war. Nach Präadsorption (1 h, RT) der polyklonalen Primärantikörper in einem 10:1 (w/w) Überschuss des korrespondierenden Peptids (siehe Tabelle 1) war ebenfalls keine IR mehr nachweisbar, was die spezifische Reaktion des Antikörpers mit seinem Epitop im Gewebe zeigte. Ebenso konnte durch Peptidpräadsorption eine mögliche Kreuzreaktivität der Antikörper mit nahe verwandten Epitopen (c-Fos/FosB) ausgeschlossen werden.

Fluoreszenzimmunhistochemie

Zur Kolokalisation zweier Antigene bzw. Phänotypisierung der Zellen die DNA-Fragmentation aufweisen (siehe 3.8.5.) wurden Immunfärbungen an nativen, frischgefrorenen Schnitten mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Die Schnitte wurden für 40 min bei 37°C aufgetaut, getrocknet und anschliessend für 20 min in 4 % PFA, 0.1 M PB, pH 7.4 bei RT fixiert. Nach 1 h Inkubation mit 12 % NGS in 0.01 M Phosphat-gepufferter Saline (PBS), pH 7.4 mit 0.3 % Triton X-100 (PBST) wurden die Schnitte in bei 4°C mit den jeweiligen Primärantikörpern (siehe Tabelle 1), verdünnt in 2 % NGS in PBST, inkubiert. Die Immunreaktion wurde durch Inkubation mit Fluorescein (FITC)- bzw. Cy[™]3-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen/-anti-Maus IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA), verdünnt 1:250 bzw. 1:1000 in PBST, für die

Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Bei Doppelfärbungen wurden die Schnitte mit beiden Primärantikörpern gleichzeitig üN und nacheinander mit den jeweiligen Sekundärantikörpern inkubiert. Die Inkubationen wurden durch mehrmaliges Spülen mit PBS beendet. Abschliessend wurden die Schnitte an der Luft angetrocknet, um das Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermindern in SlowFade™ Antifade (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) eingedeckelt und die Deckglasränder mit Paraffin versiegelt. In Kontrollschnitten, die ohne Primär- bzw. Sekundärantikörper inkubiert wurden, war keine Immunfluoreszenz (IF) nachweisbar.

Tabelle 1: Übersicht über die in der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz eingesetzten Primärantikörper und Peptide.

Bezeichnung	Epitop	Verdünnung	Hersteller
mouse monoclonal anti-Calbindin-D (CL-300)	chicken Calbindin-D (28kD) Protein	1:2,000	Sigma Chemicals, St. Louis, MO
mouse monoclonal anti-p-c-Jun (KM-1)	Peptidsequenz (NSDLLTSPDVGLL) des humanen c-Jun p39 Protein phosphoryliert an Serin-63 (SwissProt, Acc. No. P05412)	1:40,000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA
mouse monoclonal anti-Tyrosinhydroxylase (TH) (LNC1)	Peptidsequenz im mittleren Abschnitt des TH Protein	1:10,000	DiaSorin, Stillwater, MN
rabbit polyclonal anti-CM1	C-terminale Peptidsequenz (CRGTELDGDIETD) des p17 Fragments des humanen CPP32 Proteins	1:2,000	IDUN Pharmaceuticals, La Jolla, CA
rabbit polyclonal anti-c-Fos (4)	N-terminales Peptid (Aminosäuren 3-16) des humanen c-Fos p62 Protein	1:4,000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA
rabbit polyclonal anti-FosB (102)	Peptid aus der zentralen Domäne des murinen FosB Genprodukts	1:4,000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA
rabbit polyclonal anti-c-Jun (H-79)	N-terminales Peptid des humanen c-Jun p39 Protein	1:8,000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA
c-Fos (4) Peptid	FSGFNADYEASSSR (SwissProt, Acc. No.P01100)	2.5 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA
FosB (102) Peptid	ISSMAQSQGQPLASQPPAVDPYD MPGTSYSTPGLSAYSTGGASGSG GPSTSTTSGPVSARPARARRR PREETL (SwissProt, Acc. No.: P133346)	2.5 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA
c-Jun (79) Peptid	MTAKMETTFYDDALNASFLPSES GPYGYSNPKILKQSMTLNLADP VGSLKPHLRKNSDLLTSPDVG LLKLASPELERL (SwissProt, Acc. No. P05412)	2.5 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA

3.8.5. TUNEL-Färbung

Der *in situ* Nachweis von DNA-Fragmenten wurde mittels der Terminale-deoxynucleotidyl-Transferase (TdT)-vermittelten Desoxyuridin-triphosphat (dUTP) Einzelstrangbruch (Nick End)-Markierung („Labeling“) (TUNEL) nach Angaben des Herstellers (In situ cell death detection kit, Boehringer Mannheim, Deutschland) durchgeführt, modifiziert für fixierte bzw. native, frischgefrorene Schnitte.

„Free Floating“ TUNEL-Färbung

Die gewaschenen (3*10 min in 0.01 M PBS, pH 7.4) fixierten Schnitte wurden für 30 min in 0.3 % H₂O₂ in MethOH inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren, und anschliessend für 2 min in eiskaltem 0.1 % Na-Citrat, 0.1 % Triton X-100 permeabilisiert. Die

Enzymreaktion wurde durch Inkubation (1 h, 37°C) der Schnitte in der TUNEL Reaktionsmischung, bestehend aus Kalbsthymus TdT und FITC-markiertem dUTP (Enzym:markiertes Nucleotid 1:10, Boehringer Mannheim, Deutschland), 1:5 verdünnt in DNAase-Puffer (140 mM Na-Cacodylat, 4 mM MgCl₂, 0.1 mM Dithiothreitol, 30 mM Tris-HCl, pH 7.2), durchgeführt. Nachfolgend wurden die Schnitte mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Schaf-anti-FITC Antikörper für 30 min bei 37°C inkubiert (1:5 verdünnt in 0.1 % Rinderserumalbumin in PBS, Boehringer Mannheim, Deutschland) und abschliessend die Immunreaktion durch Cobalt- und Nickel-intensiviertes 3,3'-Diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB Substrate metal enhanced, Boehringer Mannheim, Deutschland) sichtbar gemacht. Jede Reaktion wurde unter leichter Bewegung ausgeführt und durch jeweils 3*10 min Waschen in PBS beendet. Die Schnitte wurden auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet, dehydriert, in Xylol geklärt und in Entellan® eingedeckelt. Positiv-Kontrollschnitte wurden vor der Enzymreaktion für 10 min bei RT mit Rinderpankreas DNAase I (0.1 mg/ml gelöst in DNAase Puffer, Boehringer Mannheim, Deutschland) verdaut, DNA-Fragmente wurden in diesen Schnitten überall nachgewiesen. In negativ-Kontrollschnitten, die in TUNEL Reaktionsmischung ohne TdT reagiert wurden, konnten keine DNA-Fragmente nachgewiesen werden. DNA-Fragmente konnten unabhängig von selektiven Gehirnregionen reproduzierbar in geringem bis mittleren Ausmass in Kernen der Ependymzellen der Meningen und des zerebralen Ventrikelsystems beobachtet werden.

Immunfluoreszenz an nativen, frischgefrorenen Schnitten

Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von DNA-Fragmenten wurden die nativen, frischgefrorenen Schnitte für 1 h bei 37°C aufgetaut und getrocknet und anschliessend für 20 min bei RT in 4% PFA fixiert. Die Permeabilisierung der Schnitte erfolgte durch Inkubation in EtOH:Eisessig 2:1 (5 min, -20°C) und 7 min Verdau mit Proteinase K (2 µg/ml in PBS, Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 37°C. Jede Behandlung wurde durch Spülen und 1*10 min Waschen in PBS beendet. Nach Vorinkubation (30 min, 37°C) der Schnitte in DNAase Puffer (140 mM Na-Cacodylat, 4 mM MgCl₂, 0.1 mM Dithiothreitol, 30 mM Tris-HCl, pH 7.2) wurde die Enzymreaktion mit TUNEL Reaktionsmischung (Enzym:markiertes Nucleotid 1:10, Boehringer Mannheim, Deutschland), 1:3 verdünnt in DNAase Puffer für 1.5 h bei 37°C durchgeführt und abschliessend durch 30 min Inkubation in 1xSSC (300 M NaCl, 30 mM Na-Citrat) bei 37°C gestoppt. Nach abschliessendem Waschen in PBS wurden die Schnitte in SlowFade™ Antifade eingedeckelt und die Deckglasränder mit Paraffin versiegelt. Bei fluoreszenzhistochemischer Doppelfärbung wurden die Schnitte nach dem letzten Waschschritt der fluoreszenzmarkierten Immunfärbung unterzogen (siehe 3.8.4).

Kontrollschnitte wurden entsprechend der ‚free floating‘ TUNEL-Färbung mit DNAase I präinkubiert (10 min, RT, 3*2 min Waschen in dH₂O, Spülen und 1*10 min Waschen in PBS) bzw. die Enzymreaktion ohne TdT durchgeführt, mit entsprechender ubiquitärer DNA-Fragmentation bzw. ohne spezifische IF im Gewebe.

3.9. Mikroskopische Auswertung

Die lichtmikroskopische quantitative und qualitative Auswertung wurde an einem Reichert-Jung Polyvar Mikroskop und einem Zeiss Axiophot I Mikroskop (Carl Zeiss Jena GmbH,

Jena, Deutschland) unter Hellfeld-Beleuchtung an kodierten Schnitten durchgeführt, so dass der Beobachter nicht in Kenntniss der Behandlungsgruppe war. Die jeweiligen histologischen, immunhistochemischen und TUNEL-Färbungen aller Gehirne eines Experiments wurden gleichzeitig durchgeführt, um Schwankungen in der Färbeintensität und -qualität zu vermeiden, und dadurch die Vergleichbarkeit der IR zu gewährleisten. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Immundoppelfärbung und TUNEL-Färbung wurde mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

3.9.1 Qualitative Bewertung der Immunreaktivität

Die lichtmikroskopische, qualitative Analyse der c-Fos-, FosB-, c-Jun- und TUNEL IR erfolgte in einem definierten rostro-kaudalen Bereich der verschiedenen Gehirnregionen (siehe Tabelle 2) anhand einer semiquantitativen Klassifizierung (durchgeführt unter 50x bzw. 100x Objektvergrößerung) der Anzahl der immunreaktiven Zellkerne und der Intensität der IR nach folgenden Kriterien: 0 = keine immunreaktiven Zellkerne; 1 = einzelne Zellkerne mit schwacher IR, 2 = wenige Zellkerne mit mittlerer bis intensiver IR; 3 = mittlere bis intensive IR mit weiter bis ubiquitärer Verteilung in der untersuchten Region. Basierend auf dieser Klassifizierung wurden die unterschiedlichen Behandlungsgruppen miteinander verglichen und die qualitative Zunahme bewertet.

Tabelle 2: Übersicht über die Gehirnregionen in denen die c-Fos, FosB, c-Jun und TUNEL IR qualitativ bestimmt wurde, sowie der rostro-kaudale Bereich (AP [mm] relativ zu Bregma) in dem die Klassifizierung durchgeführt wurde, festgelegt nach Paxinos & Watson (Paxinos und Watson, 1997). Einteilung und Zuordnung der Kortexregionen nach (Zilles und Wree, 1994).

Gehirnregion	Abkürzung: Bereich der Analyse AP [mm]
Cortex cerebri	
Cortex prefrontalis	
Cortex oribotofrontalis (lateralis/ventralis)	LO/VO: 3.20 – 2.20
Cortex insulae (agranularis/granularis)	AI/GI: 1.60
Cortex cinguli	Cg1/2: 1.60
Cortex retrosplenialis (agranularis/granularis)	RSA/RSG: -2.80 - -4.30
Cortex perirhinalis	PRh: -3.30 - -4.30
Isocortex	
Cortex frontalis	
primärer/sekundärer Motorcortex	M1/M2: 1.60
Cortex parietalis	
primärer/sekundärer somatosensorischer Cortex	S1/S2: 1.00 – 0.00
Cortex temporalis	
primärer/sekundärer auditorischer Cortex	Au1/AuD/AuV: -3.30 - -4.80
temporaler Assoziationscortex	TeA: -3.30 - -4.30
Cortex ectohinalis	Ect: -3.30 - -4.30
Cortex entorhinalis lateralis	LEnt: -3.30 - -4.30
Cortex piriformis	Pir: -1.80
Telencephalon	
Nucleus gyri diagonalis pars dorsalis	VDB: 0.48 – 0.20
Nucleus gyri diagonalis pars ventralis	HDB :0.48 – 0.20
Nucleus basalis Meynert	B: -1.40
Substantia innominata	SI: -1.40
Diencephalon	
Nucleus paraventricularis thalami	PV: -2.80
Nucleus centromedialis thalami	CM: -2.80
Nucleus mediosorsalis thalami	MD: -3.14
Zona incerta	ZI: -3.14
Nucleus hypothalamicus lateralis	LH: -2.30
Formatio hippocampi	
Gyrus dentatus	DG: -3.60
Corpus ammoni area 1	CA1: -3.60
Corpus ammoni area 2	CA2: -3.60
Corpus ammoni area 3	CA3: -3.60

Tabelle 3: Übersicht über die Gehirnregionen in denen die numerische Dichte [Neurone / mm²] der c-Fos, FosB und c-Jun IR bestimmt wurde, sowie deren rostro-kaudale (AP) Lokalisation (relativ zu Bregma [mm]), festgelegt nach Paxinos & Watson (Paxinos und Watson, 1997).

Gehirnregion	Abkürzung: AP [mm]	Schnitte [N]	Zählrahmen / Schnitt / Seite [N]
Telencephalon			
Cortex prefrontalis medialis	mPFC: 3.20 - 2.20	3	2
rostraler Nucleus caudatus/Putamen (medial/lateral)	m/ICPur: 1.70 - 1.20	2	10
medialer Nucleus caudatus/Putamen (medial/lateral)	m/ICPum: 0.48 - 0.20	2	10
caudaler Nucleus caudatus/Putamen (medial/lateral)	m/ICPuc: -0.80 - -1.0	2	10
rostraler Nucleus accumbens (core/shell Region)	Acbr/Acbshr: 2.20 - 1.70	1	2
caudaler Nucleus accumbens (core/shell Region)	Acbcc/Acbshc: 1.20 - 0.70	1	2
Globus pallidus pars lateralis	LGP: -0.80 - -1.40	2	5
Pallidum ventrale	VP: 0.20 - -0.40	2	3
Nucleus interstitialis striae terminalis (mediale/laterale Division)	BSTM/BSTL: -0.26 - -0.92	2	2
Nuclei septi medialis/lateralis	MS/LS: 1.00 - -0.20	2	2
Corpus amygdaloideum nucleus basolateralis	BLA: -2.12 - -2.80	2-3	1.5
Corpus amygdaloideum nucleus centralis	Ce: -2.12 - -2.80	2-3	2
Corpus amygdaloideum nucleus medialis	Me: -2.12 - -2.80	2-3	1.5
Diencephalon			
Globus pallidus pars medialis	MGP: -2.30 - -2.80	2	2
Nucleus subthalamicus	STN: -3.80 - 4.20	2	1.5
Mesencephalon			
Substantia nigra pars reticulata	SNR: -5.00 - -6.00	5-6	3
Substantia nigra pars compacta	SNC: -5.00 - -6.00	5-6	1
Area tegmentalis ventralis	VTA: -5.20 - -6.00	4-5	1
Pons			
Nucleus tegmentalis pedunculopontinus	PPTg: -7.30 - -8.00	3	1

3.9.2 Bestimmung der numerischen Dichte

Die Anzahl der c-Fos-, FosB- und c-Jun-exprimierenden Neurone in definierten Gehirnregionen wurde durch Bestimmung der numerischen Dichte (Zellzahl/Fläche oder Zellzahl/Volumen) abgeschätzt. Diese Abschätzung basierte sowohl auf der Anzahl als auch der Intensität der IR der Neurone in den einzelnen Regionen. Die Beobachtungen wurden manuell durchgeführt, nur Zellkerne mit einer IR, die über einer subjektiv festgelegten Intensität wahrnehmbar war, wurden gezählt (mit feststehender Hellfeldbeleuchtung und Aperturblende). Die Anzahl der immunreaktiven Kerne wurde mit Hilfe eines Zählrahmens (0.0156 mm²) in zuvor anatomisch definierten Bereichen (siehe

Tabelle 3) der einzelnen Gehirnregionen in einer 400fachen Objektvergrößerung durchgeführt.

Die Bestimmung der numerischen Dichte gilt als Methode der Wahl, um die relative Zunahme der immunreaktiven Zellkerne nach einer bestimmten (pharmakologischen) Stimulation im Vergleich zum unstimulierten Gehirn abzuschätzen, da in den untersuchten Regionen keine Veränderungen des Kernvolumens (mit Ausnahme der SNC) zu erwarten sind (Saper, 1996), und somit mögliche Fehler bei der Abschätzung der Zellzahl unter der biologischen Variabilität, die mit solcherart Experimenten verbunden ist, liegen.

Die Anzahl der Neuronen in immersionsfixierten Mittelhirnen wurde ebenfalls als numerische Dichte [Neurone/mm³] abgeschätzt, da die Qualität der Immunfärbung keine systematische stereologie-basierte Auswertung zuließ. Die Zahl der Nissl- und Tyrosinhydroxylase (TH)-gefärbten Neurone in der SNC und dem VTA wurde in einem Referenzvolumen (372,490 µm³) bei einer 400x Objektvergrößerung nach gleichen Kriterien und anatomischen Begrenzungen, wie unter 3.9.3. beschrieben, bestimmt.

3.9.3. Stereologie-basierte Abschätzung absoluter Zellzahlen

Zur Ermittlung der absoluten Neuronenzahlen im Mittelhirn, wurde eine stereologie-basierte (Gundersen et al., 1988b; Gundersen et al., 1988a; West und Gundersen, 1990) Zählmethode eingesetzt, bei der die Anzahl der Neurone einer Struktur unabhängig von deren Volumen bestimmt wird, und somit mögliche Fehlschätzungen aufgrund von läsions-induzierter, pathologischer Volumenreduktion vermieden werden.

Die quantitative stereologische Auswertung der SNC und dem VTA wurde auf 2-3 rostro-kaudalen Ebenen (siehe Tabelle 4) nach Nissl-Färbung sowie immunhistochemischer Färbung von TH und CB durchgeführt. Ausgewertet wurden 4 – 8 Schnitte pro Gehirn, wobei die Schnitte der Nissl- und TH-Färbung jeweils 160 µm voneinander entfernt waren und die der CB-Färbung 160 bzw. 320 µm.

Volumenbestimmung

Die Bestimmung der Volumina der SNC und VTA wurde für jede Färbung nach der direkten Abschätzung nach Cavalieri (Gundersen et al., 1988b) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die Umrisse der SNC und VTA in allen aufeinanderfolgenden Schnitten (6-8) der gesamten Struktur mit Hilfe einer Camera lucida gezeichnet (Vergrößerungsfaktor: 976.5625), und deren Flächen durch Auswiegen bestimmt. Hieraus berechnete sich das Gesamtvolumen der Struktur $V_{(ref)}$ nach folgender Formel:

$$V_{(ref)} = t \times \sum A_{(section)}$$

mit t = Entfernung zwischen aufeinanderfolgenden Schnitten + 1 x Schnittdicke (Nissl- und TH-Färbung: $t = 200$ µm; CB-Färbung: $t = 200$ bzw. 360 µm) und $\sum A_{section}$ = Summe der ermittelten Flächen. Der Fehlerkoeffizient (CE) (ermittelt nach Gundersen und Jensen, 1987; Gundersen et al., 1988a)) der Flächenbestimmung für jedes Individuum lag unter 10 %, was als akzeptable Präzision angesehen wurde.

Bestimmung der neuronalen Packungsdichte und der absoluten Neuronenzahl

Das Auszählen der Neurone („sampling“) wurde nach einer adaptierten Methode (Gundersen et al., 1988a) ausgeführt, wonach jedes Neuron („particle“) der umgrenzten Struktur mit gleicher Wahrscheinlichkeit gezählt werden kann. Für jedes „sampling“ wurde

der erste Schnitt pro Färbung und Gehirn zufällig ausgewählt, insgesamt wurden minimal 6 Schnitte in gleichem Abstand zueinander ausgezählt. Das Auszählen der Neurone eines Schnittes wurde in einem definierten Volumen durchgeführt, das wiederum in einzelne Schnittebenen im Abstand von 2 μm unterteilt wurde (,optical disector', Gundersen et al., 1988a). Mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv und einem digitalen Messtaster (MT25 Heidenhain, Dr. Johannes Heidenhain GmbH, Traunreut, Deutschland) wurde für jeden Schnitt zunächst die tatsächliche Dicke bestimmt (Williams und Rakic, 1988). Diese lag aufgrund von färbungs- und dehydrierungsbedingten Schrumpfungen zwischen 14 und 26 μm (z.B. um eine Faktor 2.13 reduziert) mit einem CE pro Individuum < 10%, womit sich das Volumen des ,optical disectors' von 6,250,000 μm^3 (Fläche Zählrahmen x tatsächliche Schnittdicke x Korrekturfaktor) errechnete. Die Anzahl der Neuronen (Q_{particle}) in jedem ,optical diector' (2-3 Schnitt/Seite, wobei der erste zufällig gewählt wurde und die folgendem in gleichmässigen Schritten hierzu versetzt wurden) wurde bestimmt, in dem von oben auf das Präparat fokussiert wurde und nach Einhalten eines ,guard volumes' von 2 μm jedes Neuron gezählt wurde, das innerhalb des Zählrahmens fokussiert war, ausgenommen der Neurone, die in Kontakt mit dem linken oder unteren Rand des Zählrahmens standen. Neurone wurden von Gliazellen aufgrund ihrer Grösse (Zellkörper >35 μm^2) unterschieden, und zusätzlich dadurch sie einen Nukleolus im Zellkern aufwiesen. Diese Beobachtung lieferte die neuronale Packungsdichte $C_{(\text{particle})}$, nach folgender Formel berechnet:

$$C_{(\text{particle})} = \frac{\sum Q_{i(\text{particle})}}{\sum V_{i(\text{disectors})}}$$

mit $\sum Q_{i(\text{particle})}$ = Summe der in i ,optical disectors' gezählten Neurone und $\sum V_{i(\text{disector})}$ = Summe der Volumina von i ,optical disectors'. Schliesslich wurde die absolute Neuronenzahl in der SNC und VTA nach der stereologischen Formel

$$N_{(\text{particle})} = C_{(\text{particle})} \times V_{(\text{ref})} \text{ berechnet.}$$

Die angewandte Methode lieferte Zellpackungsdichten und absolute Neuronenzahlen für alle Färbungen in der SNC und der VTA mit einem intraindivuellen Fehlerkoeffizienten CE (exemplarisch ermittelt für 1 Tier/Behandlung/Färbung nach (West und Gundersen, 1990) von 2 – 10%, was die hohe Präzision der Methode zeigt. Aufgrund der geringen Anzahl CB-positiver Neurone in der SNC, war hier die Abschätzung der Zellpackungsdichte und der absoluten Neuronenzahl mit einem CE von 21 – 50 % weniger präzise.

Tabelle 4: Übersicht über die Mittelhirnbereiche, deren rostro-kaudale Lokalisation (relativ zu Bregma [mm], nach Paxinos & Watson (Paxinos und Watson, 1997) und anatomische Begrenzung, in denen die Nissl-, TH- und CB-Färbung Stereologie-basiert ausgewertet wurden.

Gehirnregion	Abkürzung AP [mm] anatomische Begrenzung	Schnitte [N]	„optical disectors“/Schnitt /Seite [N]
rostrale Substantia nigra pars compacta	rSNC: -4.80 - -5.16 dorsomedial begrenzt vom Nucleus parabrachialis pigmentosus (PBP)	2	2-3
mediale Substantia nigra pars compacta	mSNC: -5.20 -- -5.60 nach medial getrennt vom VTA durch den Nucleus terminalis medialis des akzessorischen optischen Systems (MT) und die Fasern des medialen Lemniskussystems (ml); dorsal getrennt vom PBP	2	2-3
caudale Substantia nigra pars compacta	cSNC: -5.60 - -6.04 nach ventromedial ohne die Substantia nigra pars medialis (SNM), medial getrennt vom VTA durch die Fasern des ml, nach dorsal getrennt vom PBP	2	2-3
rostrale Area tegmentalis ventralis	rVTA: -5.20 - -5.60 nach lateral getrennt von der SNC durch den MT und ml; dorsolateral getrennt vom PBP	2-3	2
caudale Area tegmentalis ventralis	cVTA: -5.60 - -6.04 nach lateral getrennt von der SNC durch die Fasern des ml, nach dorsolateral getrennt vom PBP	2-3	2

3.9.4. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Zur Analyse der genauen zellulären Lokalisation sowie möglicher Kolokalisation der Immunfärbungen und der TUNEL-Färbung wurden Mittelhirnschnitte mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht, das im Gegensatz zum herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop die fokussierte (computergestützt) Darstellung der fluoreszierenden Strukturen sowie die Überlagerung mehrerer Einzelfärbungen erlaubt. Die hier verwendeten Anregungs- (ex) und Emissions- (em) Wellenlängen [nm] der eingesetzten Filtersätze war folgende:

FITC = eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein)-Filter: ex 488 nm Argon Laser / em Bandpass-Filter 505-530 nm

CyTM3-Filter: ex 543 nm Helium Laser / em Langpass-Filter 560 nm.

Die Analyse der aufgenommenen Bilder, sowie die Überlagerung der Einzelbilder erfolgte mit entsprechender LSM 510 Software V2.5 (Zeiss, Göttingen, Deutschland).

3.10. Statistik

Alle Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.). Die Rohdaten aller Experimente und Analysen wurden mit dem Statistikprogramm GB-Stat V6.5 (Dynamic Microsystems, Inc., Silver Spring, MD) statistisch ausgewertet. Die normalverteilten Daten der Verhaltensexperimente, der neurochemischen Analysen und DA-Rezeptorbindungsstudie wurden einem Student's-*t*-Test (bei zwei

Behandlungsgruppen) oder einer ein- oder zweifaktoriellen Varianzanalyse (1-ANOVA oder 2-ANOVA mit BEHANDLUNG als interindividueller ‚between subjects‘ Vergleich und ZEIT als intraindividueller ‚within subjects‘ Vergleich) mit wiederholten Messungen unterzogen. Die nicht-normalverteilten Daten des Katalepsietests (festgelegter ‚cut-off‘ bei 180 sek), die Dauer der Inaktivitäten in ‚open field‘, Aktivitätsbox und Schnüffelbox (‚cut off‘ bei 300 sek) sowie die histologischen Daten (geringer Stichprobenumfang) wurden mit einer nicht-parametrischen Kruskal-Wallis ANOVA bzw. bei wiederholten Messungen mit einer nicht-parametrischen Friedman ANOVA analysiert. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurden die normalverteilten Daten mit einem Tukey-Kramer *post-hoc* Test paarweise verglichen. Irrtumswahrscheinlichkeiten von $0.05 < p \leq 0.1$ wurden als statistischer Trend angesehen. Entsprechend wurden die nicht-normalverteilten Daten mit einem Mann-Whitney *U*-Test bzw. Wilcoxon-Signed Rang Test für wiederholte Messungen paarweise verglichen. Genaue Angaben finden sich jeweils in den Versuchsdurchführungen der einzelnen Experimente bzw. in den Abbildungslegenden.

4. Charakterisierung der chronischen neurodegenerativen Effekte einer bilateralen intrastriatalen 6-OHDA Injektionen

4.1. Einleitung

Die unilaterale Injektion von 6-OHDA in das dorsale Striatum der Ratte induziert eine progrediente, dosis- und läsionsortabhängige retrograde Degeneration nigrostriataler Neurone (Kirik et al., 1998; Przedborski et al., 1995). Diese beginnt 1 bis 2 Wochen nach der Injektion und hält über einen Zeitraum von 8 bis 16 Wochen an, mit zunehmendem Verlust TH-positiver Neurone in der SNC und einer korrespondierenden DA-Entleerung im CPU (Ichitani et al., 1991; Ichitani et al., 1994; Lee et al., 1996; Sauer und Oertel, 1994). Entsprechend dem Verlust DAerger Neurone (> 50 – 70 %) prägen die Tiere funktionelle Defizite, wie eine gestörte Bewegungsinitiation der ipsilateralen Vorderpfote sowie eine verminderte Geschicklichkeit in einem Futter-Greif-Test aus (Kirik et al., 1998; Lee et al., 1996). Dies definiert eine milde bis schwere Läsion, die die Symptomatik der frühen klinischen bis manifestierten Parkinson-Krankheit modellieren. Apomorphin- und Amphetamin-induziertes kontra- bzw. ipsilaterales Rotationsverhalten zeigt sich bereits bei geringen Verlusten DAerger Neurone ($\geq 50\%$) und ist daher sensitiv für präsymptomatische Läsionen, entsprechend einer präklinischen Parkinson-Krankheit (Kirik et al., 1998). Die intrastriatale 6-OHDA-Läsion stellt auf Grund der langsamen Progredienz der retrograden Degeneration sowie der dadurch verursachten abgestuften Verhaltensdefizite ein Tiermodell dar, das die degenerativen Prozesse der Parkinson-Krankheit viel eher widerspiegelt als die bisher üblichen direkten und meist vollständigen Läsionen der SNC oder des MFB mit 6-OHDA.

Obwohl dieses Tiermodell der retrograden Degeneration über eine gewisse Validität hinsichtlich des langsamen Verlaufs der Degeneration verfügt, stellen unilaterale Läsionen die pathologischen Veränderungen der Parkinson-Krankheit nur inadäquat dar. Unter der Annahme, dass das mesotelencephale DA-System im klinischen Stadium bei der Parkinson-Krankheit in beiden Hemisphären annähernd gleich von der Degeneration betroffen ist und sich die ‚extranigrale‘ Pathologie im Verlaufe der Erkrankung als Folge veränderter Transmittergleichgewichte im gesamten Gehirn entwickelt (1.5.6.), können auch nur bilaterale Läsionen diesen pathologischen Zustand im Tiermodell herstellen. Verhaltenspharmakologische Untersuchungen an MPTP-behandelten Rhesusaffen haben gezeigt, dass bilaterale, aber nicht unilaterale Läsionen des nigrostriatalen DA-Systems über eine prädiktive Validität für die Parkinson-Krankheit verfügen, mit besonderem Hinblick auf die therapeutischen Effekte aber auch unerwünschten Nebenwirkungen einer L-DOPA Behandlung (Andringa et al., 1999a; Andringa et al., 1999b). Aus diesem Grund ist es zunächst Ziel der vorliegenden Arbeit, ein Tiermodell bei der Ratte zu etablieren, in dem eine mittelschwere langsame retrograde Degeneration des gesamten DA-Systems - entsprechend einem präklinischen bis frühen klinischen Stadium der Parkinson-Krankheit-induziert wird. In Anlehnung an die beschriebenen unilaterale intrastriatalen 6-OHDA Injektionen (Kirik et al., 1998; Lee et al., 1996) sollen bilaterale Injektionen von 6-OHDA in das dorsomediale CPU durchgeführt werden. Folgende Fragestellungen sollen in Verhaltensversuchen und *post mortem* Analysen bearbeitet werden:

1. Lässt sich die postulierte Abnahme der DA-Aktivität über einen Zeitraum von 8 Wochen an der Abnahme der Spontanaktivität der Versuchstiere, sowie der Zunahme der spontanen Katalepsie als Mass für eine gestörte Bewegungsinitiation (Akinese) und Muskelrigidität (Sanberg et al., 1988; Schmidt et al., 1992) *in vivo* bewerten? Kann eine akute Injektion von Haloperidol zu einer Verstärkung der Verhaltensdefizite führen und so die postulierte DA D2-Rezeptor Supersensitivität (Ungerstedt, 1971b) nach bilateraler intrastriateller 6-OHDA-Läsion sichtbar machen?
2. Sind die auftretenden Verhaltensdefizite an eine entsprechende Verminderung von DA und einer Veränderung des Metabolismus im Vorderhirn sowie einen Verlust DAerger Neurone im ventralen Mesencephalon gebunden ?
3. Neueste *post mortem* Untersuchungen der Gehirne von Parkinson Patienten zeigen, dass DAerger Neurone, die in CB-armen Neuropilkompartimenten der SNC liegen, vulnerabler für die Degeneration sind als solche, die in CB-reichen Kompartimenten liegen (Damier et al., 1999b; Damier et al., 1999a). Weiterhin scheinen CB-haltige Neurone der SNC weniger vulnerabel für den progressiven Zelltod bei der Parkinson-Krankheit (Hirsch et al., 1992) und gegen die MPTP-induzierte Neurodegeneration (German et al., 1992; Lavoie und Parent, 1991; Liang et al., 1996) zu sein (1.5.2.). Dies lässt vermuten, dass CB eine neuroprotektive Wirkung bei möglicherweise Exzitotoxizitätsbeeinflusster Neurodegeneration besitzt. Veränderungen in der Anzahl CB-exprimierender Neurone in der SNC und im benachbarten VTA sollen zeigen, ob auch nach intrastriateller 6-OHDA Injektion bestimmte Neuronenpopulationen *per se* weniger vulnerabel gegen die 6-OHDA-induzierte Degeneration sind oder eine vermehrte Expression von CB als kompensatorischer Mechanismus während der chronischen Degeneration eine Rolle spielt.
4. Apoptotischer Zelltod scheint einer von mehreren Prozessen zu sein, die bei der Degeneration DAerger Neurone der SNC eine Rolle spielen (Dunnett und Björklund, 1999), auch wenn humane *post mortem* Analysen dies nicht konsistent unterstützen (1.5.3.). So konnten einige Studien eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellkerne in der SNC von Parkinson Patienten nachweisen (Burke und Kholodilov, 1998; Tatton et al., 1998; Tatton und Kish, 1997) andere Untersuchungen gehen von nicht-apoptotischen Prozessen aus (Jellinger, 2000; Wüllner et al., 1999). Alternativ wurde der Begriff *Aposklesis* vorgeschlagen, der einen langsamen, unphysiologischen Prozess beschreibt, in dem die SNC Neurone zwar DNA-Fragmentation aufweisen aber keine Chromatinkondensation oder Kernfragmentationen (Graeber et al., 1999). Im Tiermodell löst die Injektion von 6-OHDA sowohl in das MFB als auch in das Striatum akute bis langanhaltende Apoptose (in einem Zeitraum bis 14 Tage nach Injektion des Toxins) in DAergen Neuronen der SNC aus, gemessen an dem auftreten von DNA-Fragmentationen (He et al., 2000a; Marti et al., 2000; Zuch et al., 2000). In Ergänzung zu diesen Untersuchungen soll hier das Ausmass der DNA-Fragmentationen nach einem Zeitraum von 8 Wochen nach Läsion mit Hilfe der TUNEL-Methode untersucht werden, um die chronischen Prozesse, die der ‚nigralen‘ Pathologie zugrunde liegen, genauer charakterisieren.
5. Unter der Annahme, dass die ‚extranigrale‘ Pathologie durch eine chronisch veränderte Transmitterbalance in den betroffenen Kerngebieten hervorgerufen wird und damit zwar

nicht unmittelbar degenerative Prozesse wohl aber langfristige Veränderungen der neuronalen Funktion ausgelöst werden, stellt sich die Frage ob und wo die retrograde 6-OHDA-Läsion Funktionsveränderungen auslösen kann. Zahlreiche tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass unilaterale Injektionen von 6-OHDA in das MFB oder das dorsale CPu eine langanhaltende Expression der iTFs c-Fos und c-Jun in Neuronen des CPu, der SNC aber auch nachgeschalteter Strukturen der Basalganglien auslösen kann (Dragunow et al., 1991; Dragunow et al., 1995; Hebb und Robertson, 1999; Jenkins et al., 1993). Da beide iTFs sehr eng mit Veränderungen neuronaler Aktivität und Funktion, verzögertem Zelltod oder Regeneration geschädigter Neurone in Verbindung gebracht werden (siehe 1.6.) (Zusammenfassungen in Dragunow und Preston, 1995; Herdegen und Leah, 1998; Herrera und Robertson, 1996), soll deren spezifisches Expressionsmuster 8 Wochen nach intrastriärer 6-OHDA-Läsion Rückschlüsse auf mögliche ‚sekundäre‘ Funktionsveränderungen in den Kernen der Basalganglien, sowie eng assoziierten limbischen Strukturen und den cholinergen Vorderhirn- und Hirnstammkernen ermöglichen.

4.2. Versuchsdurchführung

Zur Charakterisierung der chronischen neurodegenerativen Effekte einer bilateralen intrastriären 6-OHDA Injektion wurden 24 adulte, männliche Sprague-Dawley Ratten operiert. Nach angegebenem Operationsverfahren (siehe 3.2) wurden pro Striatum 14 µg/2µl 6-OHDA (N=12), verteilt auf zwei Injektionsorte an folgenden Injektionskoordinaten infundiert: AP: 0.5/-0.4 mm, lateral: ±2.8/±3.4 mm, dorsoventral: -5.0/-4.8 mm. Kontrolltieren (N=12) wurde das entsprechende Volumen (2 x 1 µl/Striatum) 0.1 % Ascorbat, 0.9% NaCl infundiert. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe Tabelle 5) nach der Läsion auf spontane (Läsions-bedingte), bzw. Haloperidol-induzierte (0.25 mg/kg i.p.) Verhaltensveränderungen getestet (siehe 3.5.). Die Gehirne wurden 56 Tage nach der Läsion für neurochemische (siehe 3.6.1) und histologische (siehe 3.8.1.) Untersuchungen entnommen und präpariert.

Tabelle 5: Zeitplan der Versuchsdurchführung

Tag	Behandlung/Versuch
0	Operation
11	Spontanverhalten: Katalepsie, Lokomotion, Exploration, Schnüffeln
26	Spontanverhalten: Katalepsie, Lokomotion, Exploration, Schnüffeln
27	Haloperidol-induzierte Katalepsie
41	Spontanverhalten: Katalepsie, Lokomotion, Exploration, Schnüffeln
55	Spontanverhalten: Katalepsie, Lokomotion, Exploration, Schnüffeln
56	Dekapitierung, Perfusion

4.3 Ergebnisse

Von 12 Tieren, die eine bilaterale 6-OHDA-Läsion erhalten hatten, musste ein Tier in der ersten postoperativen Woche wegen postoperativer Komplikationen eingeschläfert werden. Weitere operations- oder Läsions-bedingte Ausfälle wurden nicht verzeichnet. Die 6-OHDA behandelten Tiere zeigten keine Adipsie oder Apathie, konsequenterweise ergab die Überwachung der Körpergewichte eine normale Gewichtszunahme beider

Behandlungsgruppen über den Untersuchungszeitraum ohne Einfluss der 6-OHDA-Läsion oder Interaktion [2-ANOVA für Faktor ZEIT: $F_{4,92}=113.86$, $p<0.0001$].

4.3.1. Spontanverhalten

Katalepsietest

Die intrastriale 6-OHDA-Läsion führte zu einer robusten Zunahme der Katalepsie über 55 Tage im Vergleich zu den Kontrolltieren (

Abb. 13). Diese Befunde werden gestützt durch eine signifikante nicht-parametrische Kruskal-Wallis ANOVA [Gitter: $\chi^2=24.7$, $p=0.0008$; Stange: $\chi^2=48.3$, $p<0.0001$]. Im Zeitverlauf nahm die Katalepsie nach 6-OHDA-Läsion an der Stange signifikant zu [Friedman-ANOVA: $\chi^2=16.8$, $p=0.0001$]. Die Kontrolltiere entwickelten ebenfalls eine ZEIT-abhängige Zunahme der Katalepsie während wiederholter Tests [Friedman-ANOVA: Gitter: $\chi^2=8.65$, $p=0.03$; Stange: $\chi^2=23.3$, $p<0.0001$].

„open field“ mit „hole board“

Bezüglich der untersuchten Verhaltensparameter induzierte die intrastriale 6-OHDA-Läsion eine signifikante Abnahme der lokomotorischen und explorativen Aktivität (Abb. 14). Die Vorwärtslokomotion (Felderwechsel) war ZEIT-abhängig signifikant reduziert [$F_{2,68}=25.2$, $p<0.0001$] mit einer signifikanten Interaktion zwischen BEHANDLUNG und ZEIT [$F_{2,68}=5.2$, $p=0.01$]. Die Dauer der Immobilität verlängerte sich in beiden Behandlungsgruppen bei wiederholtem Testen [Friedman-ANOVA: Kontrolle: $\chi^2=15.2$, $p=0.0005$; OHDA: $\chi^2=16.9$, $p=0.0002$], war aber nach 56 Tagen als Folge der 6-OHDA-Läsion signifikant erhöht [Kruskal-Wallis ANOVA: $\chi^2=3.88$, $p=0.05$]. Die Analyse der vertikalen Exploration ergab eine LÄSIONS-bedingte [$F_{1,68}=13.3$, $p=0.002$], ZEIT-abhängige [$F_{2,68}=18.9$, $p<0.0001$] Abnahme des Aufrichtens, mit einer signifikanten Interaktion [$F_{2,68}=4.4$, $p=0.02$]. Weiterhin nahm die Anzahl der „head dips“ im Verlaufe wiederholter Tests in beiden Behandlungsgruppen signifikant ab [$F_{2,68}=30.2$, $p<0.0001$], ohne Effekte der 6-OHDA-Läsion.

Experimentierkammer

Die in der Experimentierkammer ermittelten Verhaltensparameter (Abb. 15) zeigten keine wesentlichen Veränderungen nach 6-OHDA-Läsion, mit Ausnahme des spontanen Schnüffelverhaltens, das an Tag 41 signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht war. [$F_{1,68}=4.7$, $p=0.04$]. Insgesamt zeigte sich eine ZEIT-abhängige Abnahme der Aktivität im Verlaufe wiederholter Tests [Friedman-ANOVA: Kontrolle: $\chi^2=6.5$, $p=0.04$; OHDA: $\chi^2=11.5$, $p=0.003$].

4.3.2. Wirkung von Haloperidol auf die Katalepsie

Die akute Injektion von Haloperidol hatte weder an der Stange noch am Gitter Auswirkungen auf die Katalepsie nach intrastrialer 6-OHDA-Läsion (ohne Abbildung).

4.3.3. Neurochemie

Die Wirkungen der bilateralen intrastrialen 6-OHDA-Läsion auf den Gewebegehalt der biogenen Amine DA, NA und 5-HT sowie deren Metaboliten DOPAC, HVA und 5-HIAA im rostralen und kaudalen CPu, Acb und mPFC sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die intrastriale 6-OHDA Injektion induzierte eine signifikante DA-Entleerung im kaudalen CPu auf 52.7 ± 10.6 % der Kontrolle [Student's-t-Test: $t(10)=2.2$, $p=0.05$]. Entsprechend

konnte die statistische Analyse einen Trend zu einem erhöhten DA-Umsatz im kaudalen CPu nach 6-OHDA-Läsion zeigen [HVA/DA: $134.4 \pm 11.5\%$ der Kontrolle; Student's-*t*-Test: $t(10)=2.0$, $p=0.07$]. In den anderen untersuchten Gehirnregionen hatte die intrastriatale 6-OHDA-Läsion keinen Effekt auf den Gehalt der biogenen Amine.

4.3.4. Histologie

Veränderungen ventraler Mittelhirnneurone

Die intrastriatale 6-OHDA Infusion induzierte eine nach 8 Wochen signifikante retrograde Degeneration in der SNC und im VTA (Abb. 17A,B Abb. 20B,D). Die Anzahl der TH-positiven Neurone in der SNC war auf $52.2 \pm 4.6\%$ der Kontrolltiere reduziert, im VTA entsprechend auf $55.6 \pm 4.0\%$ [Kruskal-Wallis ANOVA: SNC: $\chi^2=12.6$, $p=0.0004$; VTA: $\chi^2=14.3$, $p=0.0002$]. Der Verlust TH-positiver Neurone (Abb. 20B,D) wurde begleitet von einer deutlichen Reduktion TH-positiver Fasern im dorsalen CPu (Abb. 16, Abb. 20E) Aufgrund methodischer Schwierigkeiten bei der Thionin-Färbung konnten nur 2 Mittelhirne der 6-OHDA-Läsionen und 3 der Kontrollen ausgewertet werden. Die geschätzte Abnahme der Neuronenzahl lag hier in der SNC bei 38% der Kontrolltiere bzw. 54% im VTA. Die morphologische Untersuchung der Nissl-gefärbten Schnitte zeigte deutlich eine verminderte Zelldichte in der SNC (

Abb. 19B), wobei der grösste Teil der verbliebenen Neurone in der SNC nach retrograder Degeneration pyknotisch und atrophiert erschien. Wenige Neurone zeigten sich mit einem aufgehellten Zytoplasma und einer aufgelösten Kernmembran (

Abb. 19B), was auf mögliche anhaltende pathomorphologische Veränderungen in der SNC hinweist.

Acht Wochen nach intrastriatale 6-OHDA Infusion nahm im ventralen Mittelhirn die Anzahl der Neurone zu, die CB exprimieren (Abb. 21). Die relative Zunahme im Vergleich zu den Kontrolltieren betrug in der SNC $159.0 \pm 19.6\%$ und $136.6 \pm 9.9\%$ im VTA [Kruskal-Wallis ANOVA: SNC: $\chi^2=4.63$, $p=0.03$; VTA: $\chi^2=5.83$, $p=0.029$] (Abb. 17C,D).

Quantitative Zunahme der c-Fos Expression

Die immunhistochemische Färbung der iTFs c-Fos und c-Jun ergab eine ausschliesslich nukleäre Lokalisation ohne unspezifische Anfärbung des Zytoplasmas (Abb. 22). Die qualitative Analyse (siehe 3.9.1) wies auf anhaltende Effekte der intrastriatalen 6-OHDA-Läsion auf die Expression von c-Fos in verschiedenen Kerngebieten der Basalganglien, des EA Komplexes sowie cholinergen Vorderhirn und Hirnstammkernen (siehe Tabelle 7). Die Bestimmung der numerischen Dichte (siehe 3.9.2) ergab eine signifikante Zunahme der c-Fos IR im BSTM [Kruskal-Wallis ANOVA: $\chi^2=5.3$, $p=0.02$] und einen Trend zu einer LÄSIONSbedingten, erhöhten c-Fos Expression im kaudalen CPu [Kruskal-Wallis ANOVA: $\chi^2=3.0$, $p=0.08$]. In der SNC wurde eine anhaltende Expression von c-Fos 8 Wochen nach 6-OHDA-Läsion beobachtet, wobei keine c-Fos IR in der SNC der Kontrolltiere nachgewiesen wurde. In den anderen Regionen erreichte die Wirkung der 6-OHDA-Läsion auf die Expression von c-Fos keine statistische Signifikanz (Abb. 18).

Qualitative Veränderung der c-Jun Expression

Die 6-OHDA-Läsion erhöhte die Expression von c-Jun anhaltend in verschiedenen Gehirnregionen (siehe Tabelle 7), wobei die ausgeprägteste Induktion im dorsomedialen

Bereichen des rostralen und kaudalen CPu, sowie in beiden Subregionen des Acb beobachtet wurden. Da in der SNC der Kontrolltiere keine c-Jun IR nachweisbar war, resultierte dies in einer Nettozunahme der c-Jun Expression nach 6-OHDA-Läsion. Eine relative Zunahme der c-Jun IR wurde in den Kernen des EA Komplex sowie den CA1- und CA3-Subregionen der Hippokampusformation beobachtet.

Qualitativer Nachweis von DNA-Fragmentation

Der Nachweis von DNA-Fragmentation mit der TUNEL-Methode konnte bis auf eine gewisse Anzahl TUNEL-positiver Zellkerne in den Ependymzellen der Meningen und des zerebralen Ventrikelsystems keine TUNEL-positiven Neurone in den Gehirnen der Kontrolltiere zeigen. Im Gegensatz dazu wurden einige wenige TUNEL-positive Neurone (die Anzahl lag zwischen 1-5 Schnitt) in der SNC und im VTA nachgewiesen. Darüberhinaus zeigten ebenfalls vereinzelte Neurone des BSTM, des LS, des HDB sowie des DG Anzeichen einer DNA-Fragmentation (siehe Tabelle 7).

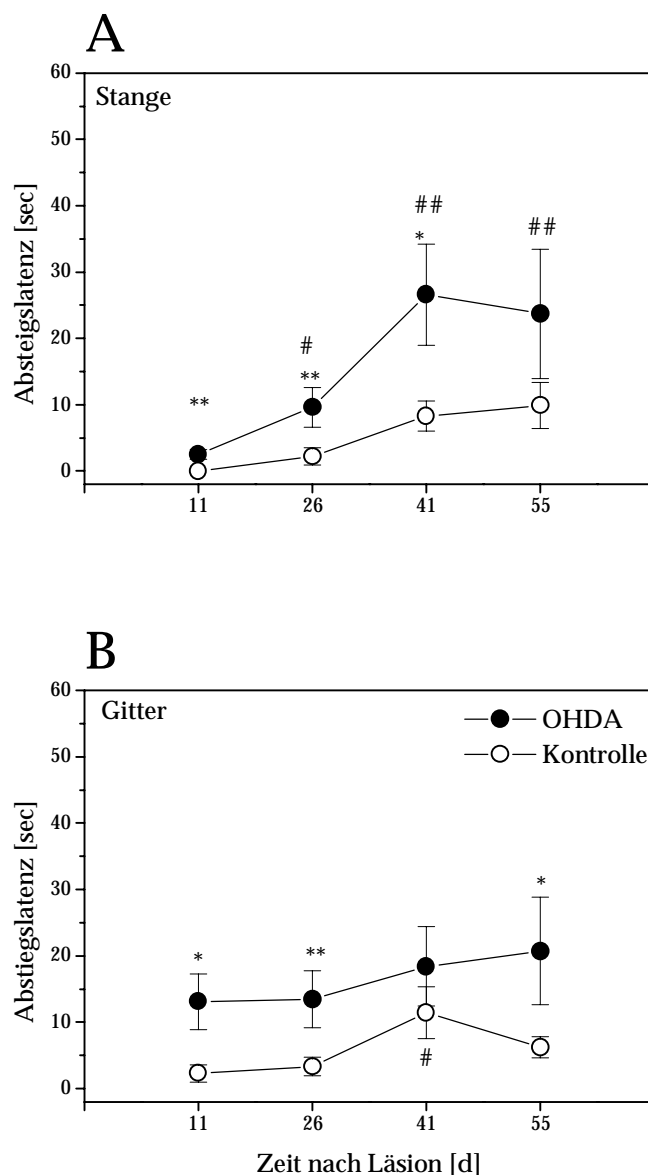


Abb. 13: Wirkung bilateraler intrastriatarer 6-OHDA-Läsionen (N=11) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=12) auf die spontane Katalepsie gemessen an der vertikalen Stange (A) und am horizontalen Gitter (B) zu verschiedenen Zeitpunkten (11, 26, 41, 55 Tage) nach Läsion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney *U*-Test für paarweisen Vergleich); (A) # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Tag 11, (B) # $p < 0.05$ vs. Tag 11 und 26 (Wilcoxon-Signed Rang Test für paarweisen Vergleich bei wiederholter Messung).

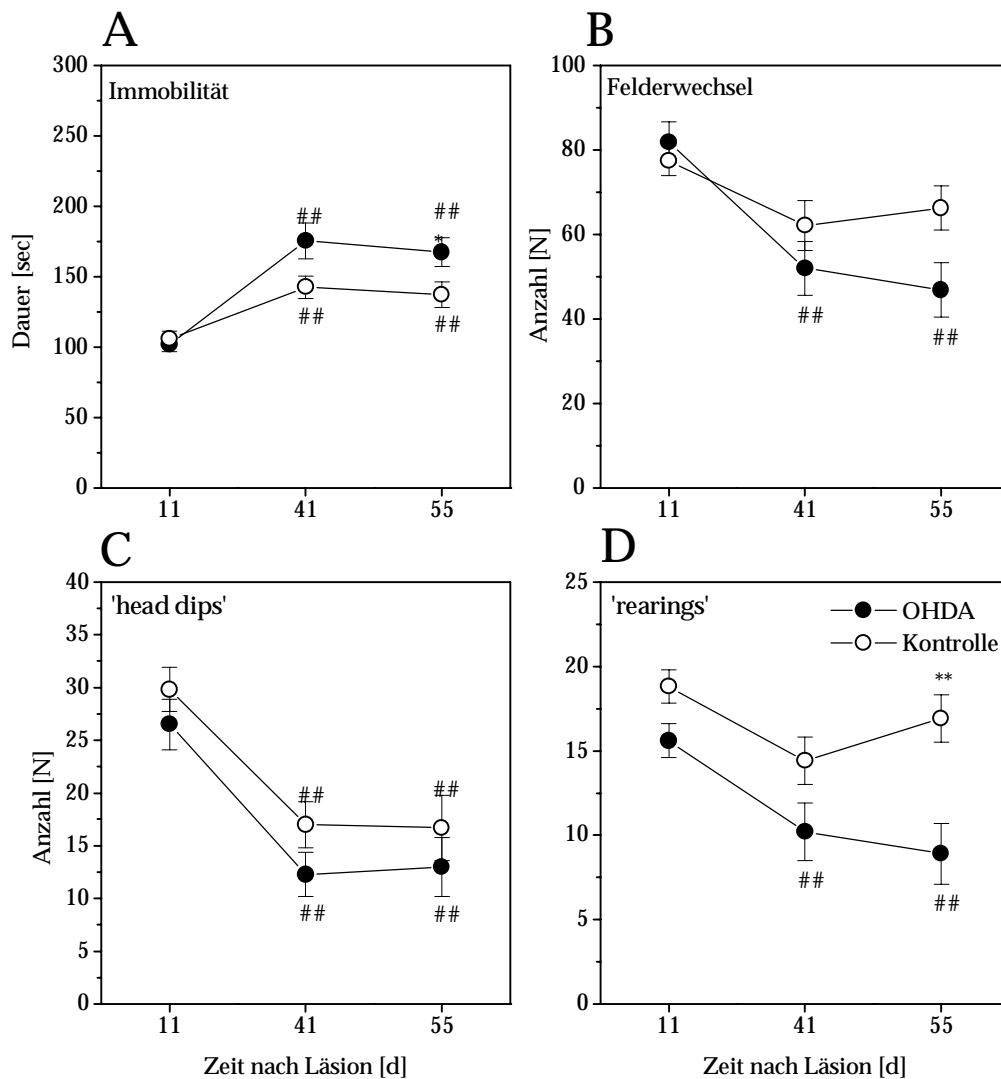


Abb. 14: Wirkung bilateraler intrastriateller 6-OHDA-Läsionen auf die spontane Lokomotion und Exploration [Immobilität (A), Vorwärtslokomotion (B), Anzahl der ‚head dips‘ (C) und ‚rearings‘ (D)] im ‚open field‘ zu verschiedenen Zeitpunkten (11, 41, 55 Tage) nach 6-OHDA-Läsion (N=11) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=12). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; (A): * $p < 0.05$ (Mann-Whitney *U*-Test für paarweisen Vergleich); ## $p < 0.01$ vs. Tag 11 (Wilcoxon-Signed Rang Test für paarweisen Vergleich bei wiederholter Messung); (B-D): ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle; ## $p < 0.01$ vs. Tag 11 (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

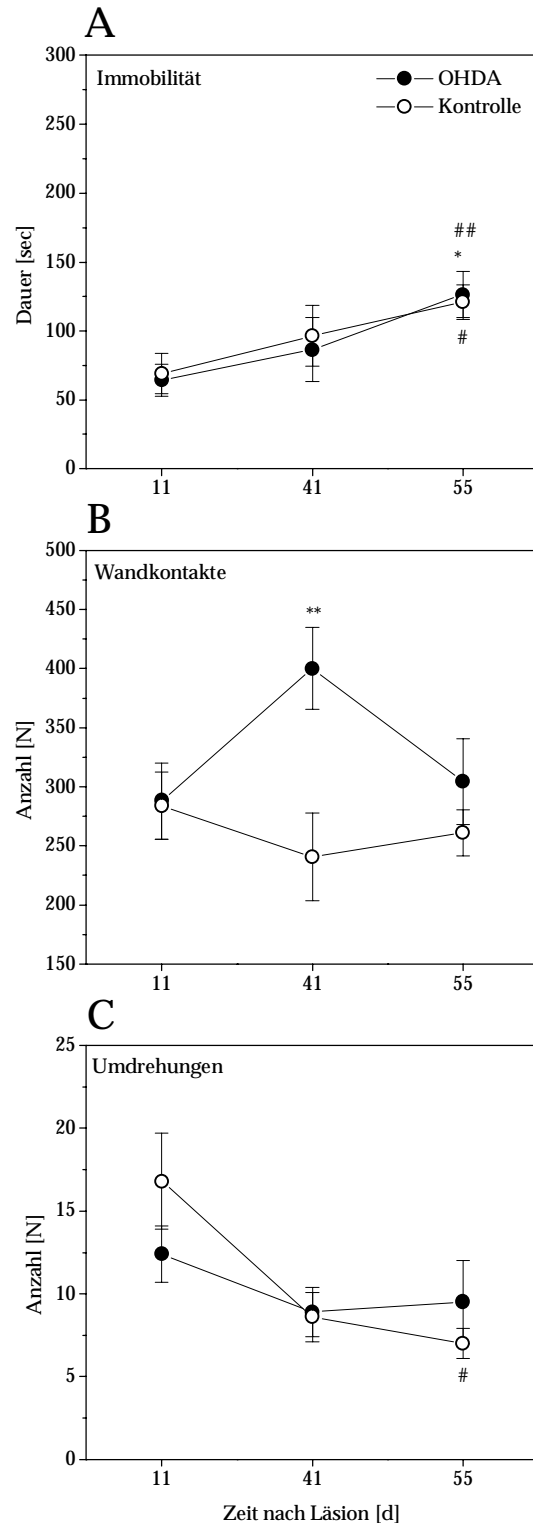


Abb. 15: Wirkung bilateraler intrastriatraler 6-OHDA-Läsionen auf das spontane Schnüffelverhalten [Immobilität (A), Wandkontakte (B) und Umdrehungen (C)] in der Experimentierkammer zu verschiedenen Zeitpunkten (11, 41, 55 Tage) nach 6-OHDA-Läsion (N=11) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=12). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; (A): * $p < 0.05$ vs. Tag 41, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Tag 11 (Wilcoxon-Signed Rang Test für paarweisen Vergleich bei wiederholter Messung); (B, C): ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle, # $p < 0.05$ vs. Tag 11 (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

Tabelle 6: Übersicht über den Gehalt der biogenen Amine und deren Metaboliten im Vorderhirn 8 Wochen nach bilateraler intrastriateller 6-OHDA-Läsion

Gehirnregion	Transmitter amine	Kontrolle	6-OHDA-Läsion	rel. Veränderung
		Gehalt [pg/mg]	Gehalt [pg/mg]	% der Kontrolle
CPu rostral	NA	1737.5±469.1	857.1±369.8	49.3±21.3
	DOPAC	4228.1±2097.5	1467.8±849.0	34.7±20.1
	DA	111107.1±2289.1	6640.3±2283.9	59.7±20.6
	5-HIAA	370.2±50.0	334.2±67.4	90.3±18.2
	HVA	496.8±126.6	486.8±103.9	98.0±20.9
	DOPAC/DA	0.57±0.29	0.44±0.36	76.8±63.7
	HVA/DA	0.05±0.01	0.08±0.02	178.8±32.7
	5-HIAA/5-HT	0.63±0.05	0.94±0.27	149.2±42.9
	5-HT	610.9±104.2	514.6±111.6	84.2±18.3
CPu kaudal	NA	2174.5±334.2	1935.1±436.6	89.0±20.1
	DOPAC	614.7±215.8	360.9±120.2	58.7±19.6
	DA	12403.8±2284.8	6537.6±1310.0*	52.7±10.6
	5-HIAA	791.1±332.0	492.0±95.1	62.2±12.0
	HVA	749.5±142.6	510.0±78.5	68.0±10.5
	DOPA/DA	0.05±0.01	0.05±0.01	112.5±31.3
	HVA/DA	0.06±0.01	0.08±0.01 (p=0.07)	134.4±11.5
	5-HIAA/5-HT	0.93±0.5	0.6±0.13	59.1±12.9
	5-HT	842.1±162.9	934.7±78.5	111.0±9.3
Acb	NA	1054.0±233.5	780.2±207.9	74.3±19.6
	DOPAC	1442.3±426.9	1967.2±803.0	136.4±55.7
	DA	10359.2±2609.4	7549.6±1024.4	72.9±9.9
	5-HIAA	704.2±212.5	605.6±70.7	86.0±10.0
	HVA	694.7±184.4	497.2±45.6	71.6±6.6
	5-HT	1048.5±240.9	902.9±92.3	86.1±8.8
	DOPA/DA	0.13±0.01	0.16±0.01	121.5±8.5
	HVA/DA	0.07±0.01	0.07±0.005	90.4±7.3
	5-HIAA/5-HT	0.63±0.04	0.68±0.07	106.6±10.8
mPFC	NA	92.8±42.7	189.7±58.0	204.3±62.5
	DOPAC	5.1±1.6	17.1±6.8	332.9±133.1
	DA	124.2±75.5	189.8±48.3	152.8±38.9
	5-HIAA	112.8±54.1	232.2±84.5	205.9±74.9
	HVA	22.4±8.6	38.1±13.6	170.2±61.0
	5-HT	189.1±79.9	396.1±137.8	209.5±72.9
	DOPA/DA	0.07±0.02	0.13±0.04	195.5±66.7
	HVA/DA	0.25±0.06	0.21±0.05	84.0±20.8
	5-HIAA/5-HT	0.56±0.03	0.53±0.05	94.6±9.0

Wirkung der intrastriatellen 6-OHDA-Läsion (N=6) auf den absoluten Gewebegehalt [pg/mg Frischgewicht] der biogenen Amine und Metaboliten im Vorderhirn sowie deren relative Veränderungen zu den Kontrolltieren (N=6). Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M, * p<0.05 (Student's-t-Test).

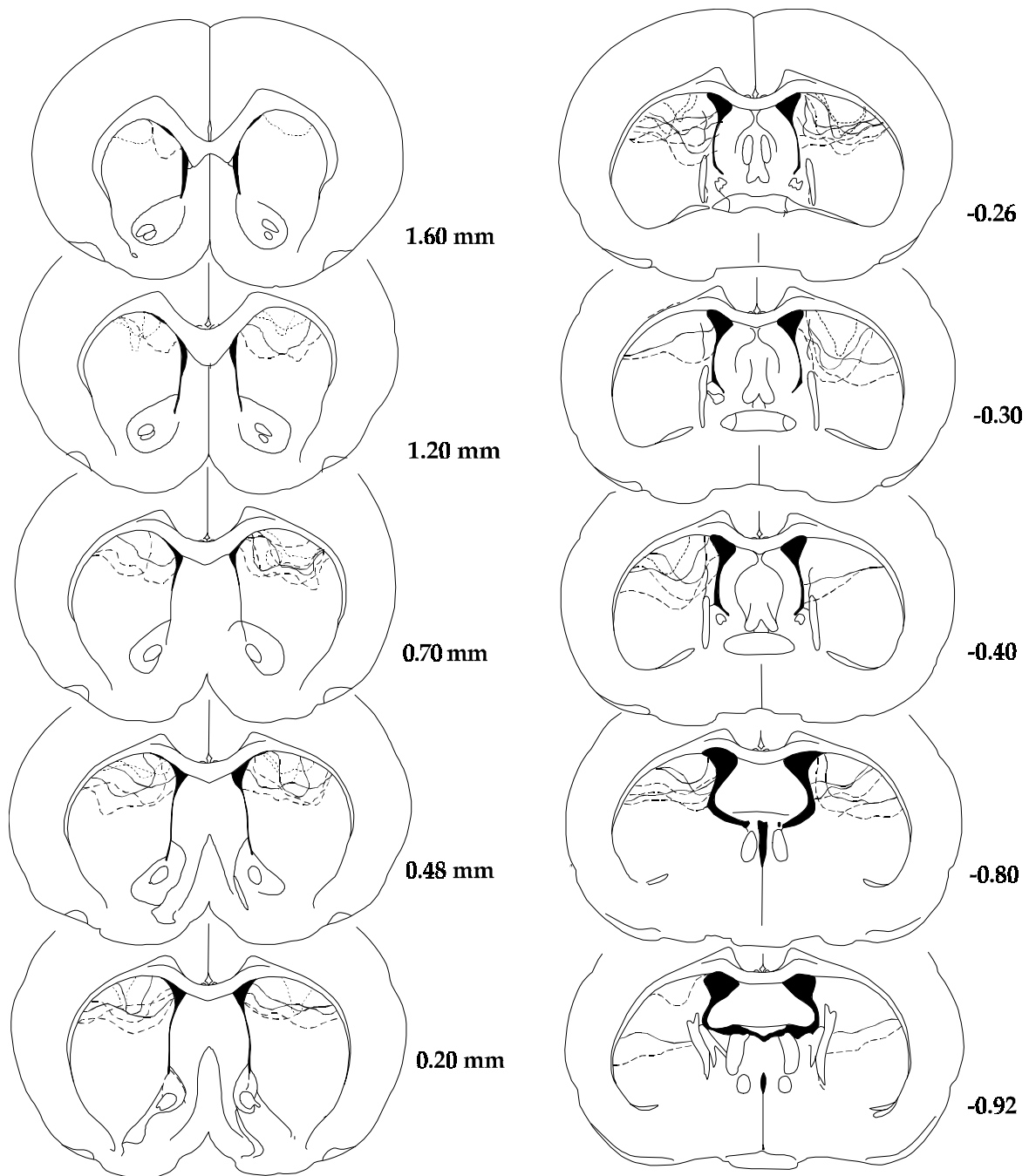


Abb. 16: Schematische Übersicht über die Lokalisation und Ausdehnung der 6-OHDA-Läsionen im dorsalen CPu, dargestellt in koronaren Schnittebenen (angepasst von Paxinos und Watson, 1997) durch das CPu. Der vollständige Verlust TH-positiver Fasern wird durch die durchgezogenen Linien markiert, die gestrichelten Linien umgrenzen den Bereich in denen die Dichte TH-positiver Fasern reduzierte war. Die striatale Läsion beinhaltet dorsomediale und dorsolaterale Regionen des CPu. Die Nissl-Färbung zeigt eine auf die Spitze der Injektionskanüle beschränkte Gliose (gepunktete Linie), innerhalb der striatales Parenchym geschädigt war.

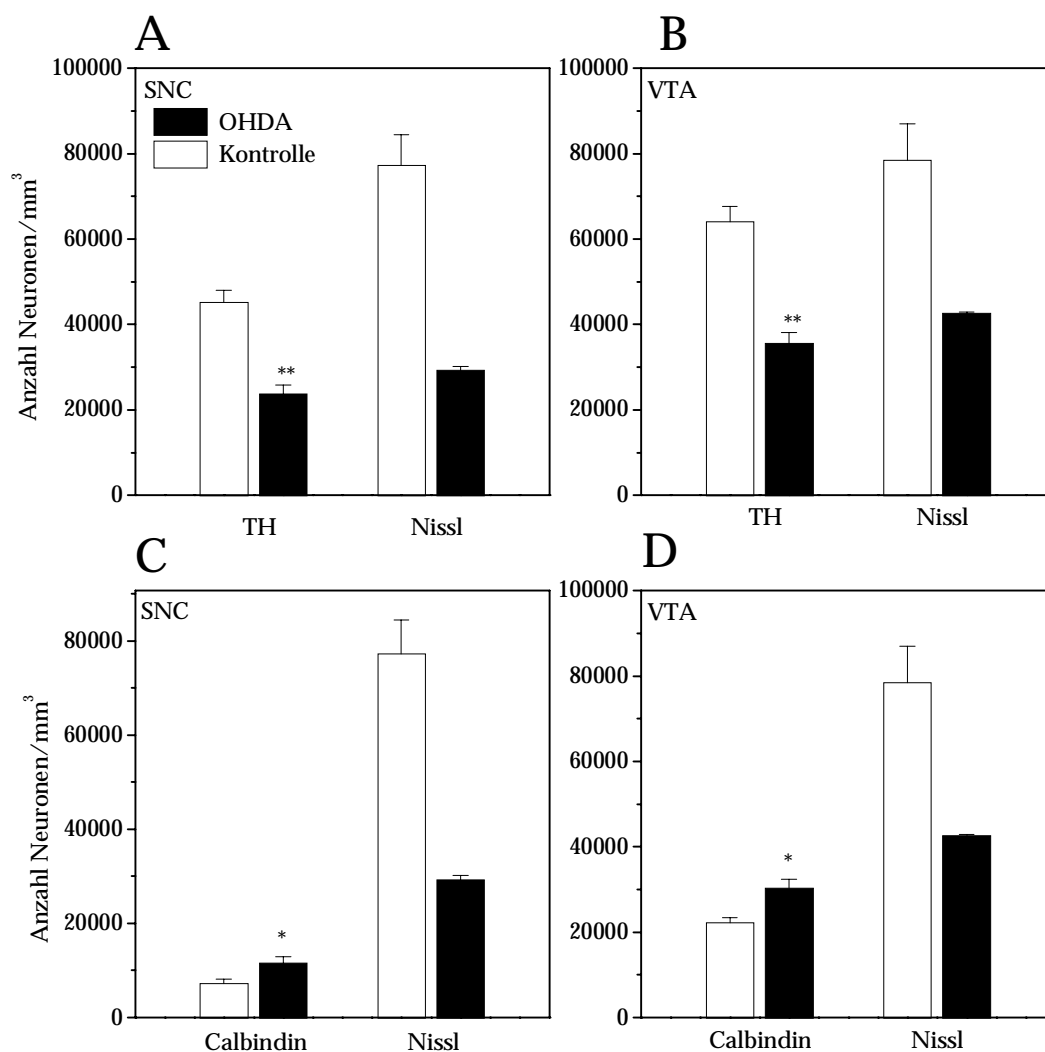


Abb. 17 : Wirkung bilateraler intrastriärer 6-OHDA-Läsionen (N=5) auf die Anzahl TH-positiver (A, B) und Calbindin-positiver (C, D) ventraler Mittelhirnneurone im Vergleich zur Injektion von 0.1% Ascorbat (N=6). Dargestellt ist die Zellpackungsdichte (Anzahl der Neurone/mm³, Mittelwerte \pm S.E.M.); * p < 0.05, ** p < 0.01 (nicht-parametrische Kruskal-Wallis ANOVA).

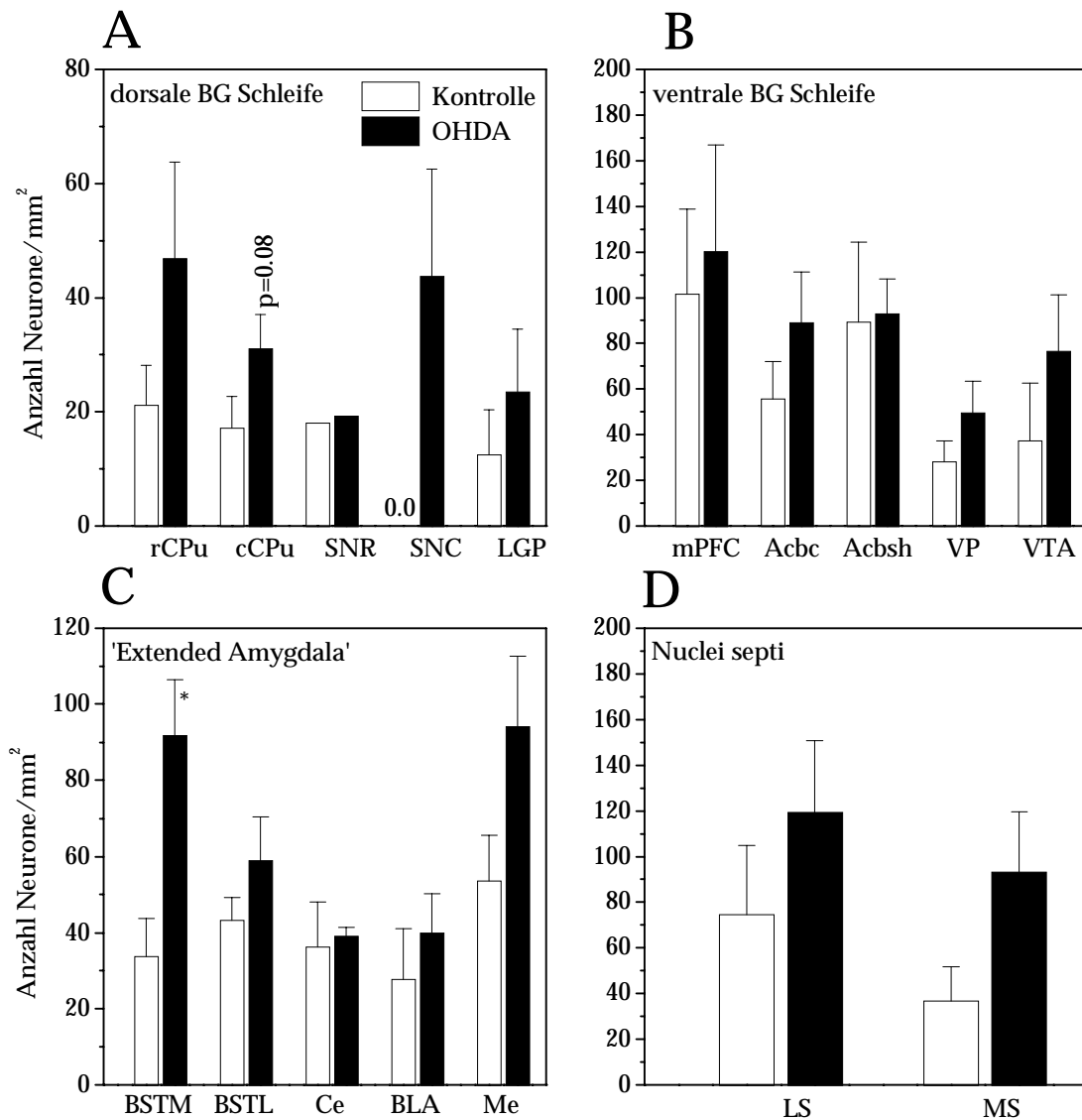


Abb. 18: Übersicht über Wirkung bilateraler intrastriärer 6-OHDA-Läsionen (N=5) auf die Expression von c-Fos 8 Wochen nach der Läsion in der dorsalen (A) und ventralen (B) Basalganglienschleife, sowie den Kerngebieten der 'Extended Amygdala' (C) und des Septums (D), verglichen mit Kontrollgehirnen (N=6). Dargestellt sind die numerischen Dichten (Anzahl Neurone/mm²; Mittelwerte \pm S.E.M); * $p < 0.05$ (nicht-parametrische Kruskal-Wallis ANOVA).

Tabelle 7: Übersicht über die qualitativen Zunahmen der c-Fos und c-Jun Expression nach intrastriärer 6-OHDA-Läsion sowie der Verteilung TUNEL-markierter Zellkerne in ausgewählten Gehirnregionen.

Gehirnregion	c-Fos	c-Jun	TUNEL
Cortex cerebri			
mPFC	++ ^a	++	-
Cg1/2	+	++	-
M1/2	+	+	-
S1/2	+	++	-
RSG/RSA	+	++	-
Au1/AuD/AuV	++	++	-
Pir	+	+++	-
LEnt	+	++	-
Telencephalon			
m/lCPur	+++ ^a	+	-
m/lCpuc	+++ ^a	++	-
Acbc	++ ^a	+++	-
Acbsh	++ ^a	+++	-
LGP	++ ^a	+	-
VP	++ ^a	-	-
LS	++ ^a	++	+ ^b
MS	++++ ^a	+	-
VDB	+	-	+ ^b
HDB	+	-	+ ^b
SI	+	-	-
BSTM	++++ ^{a*}	++	+ ^b
BSTL	++ ^a	++	-
Ce	++ ^a	++	-
Me	++++ ^a	++	-
BLA	++ ^a	++	-
Diencephalon			
PV	+	+	-
CM	+	+	-
MD	-	+	-
MGP	+	-	-
STN	-	-	-
ZI	+++ ^a	-	-
Mesencephalon			
SNC	++++ ^a	+++	+ ^b
SNR	++ ^a	-	-
VTA	++ ^a	+	+ ^b
Formatio hippocampi			
DG	+	-	+ ^b
CA1	+	++	-
CA2	-	+	-
CA3	+	++	-
Pons			
PPTg	++++ ^a	-	-

Zunahme der c-Fos und c-Jun IR, sowie von Neuronen mit nachweisbarer DNA-Fragmentation (TUNEL) 8 Wochen nach 6-OHDA-Läsion (N=4-5) verglichen mit der Injektion von 0.1 % Ascorbat (N=4-6). Dargestellt ist die relative Zunahme der IR zur Kontrollgruppe: - = keine IR; + = nachweisbare IR ohne Zunahme; ++ = mässige Zunahme der IR; +++ = ausgeprägte Zunahme der IR. ^a Regionen in denen die numerische Dichte bestimmt wurde. * p<0.05 (Kruskal-Wallis ANOVA). ^b Nettozunahme der TUNEL IR, da keine TUNEL-markierten Neurone in den entsprechenden Regionen der Kontrolltiere nachgewiesen wurden.

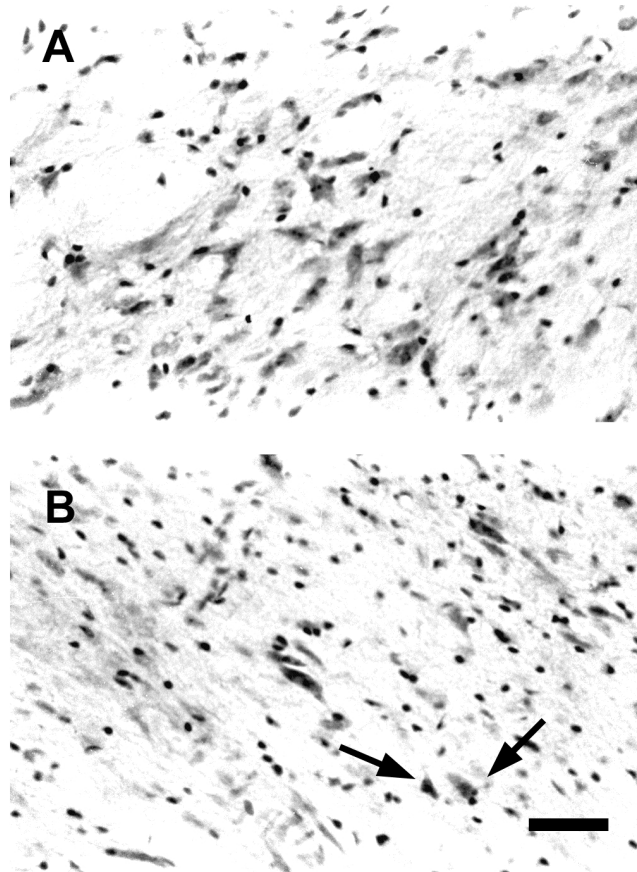


Abb. 19: Mikrophotographien der SNC (-5.60 mm kaudal von Bregma) 56 Tage nach intrastriateller Infusion von 0.1 % Ascorbat (A) oder 6-OHDA (B). Die Nissl-Färbung zeigt eine verminderte neuronale Dichte und Gliose. Einzelne verbleibende Neurone der SNC erscheinen atrophiert (Pfeile), mit kondensiertem Kernplasma und Chromatin (Pyknose). Massstab = 90 μ m.

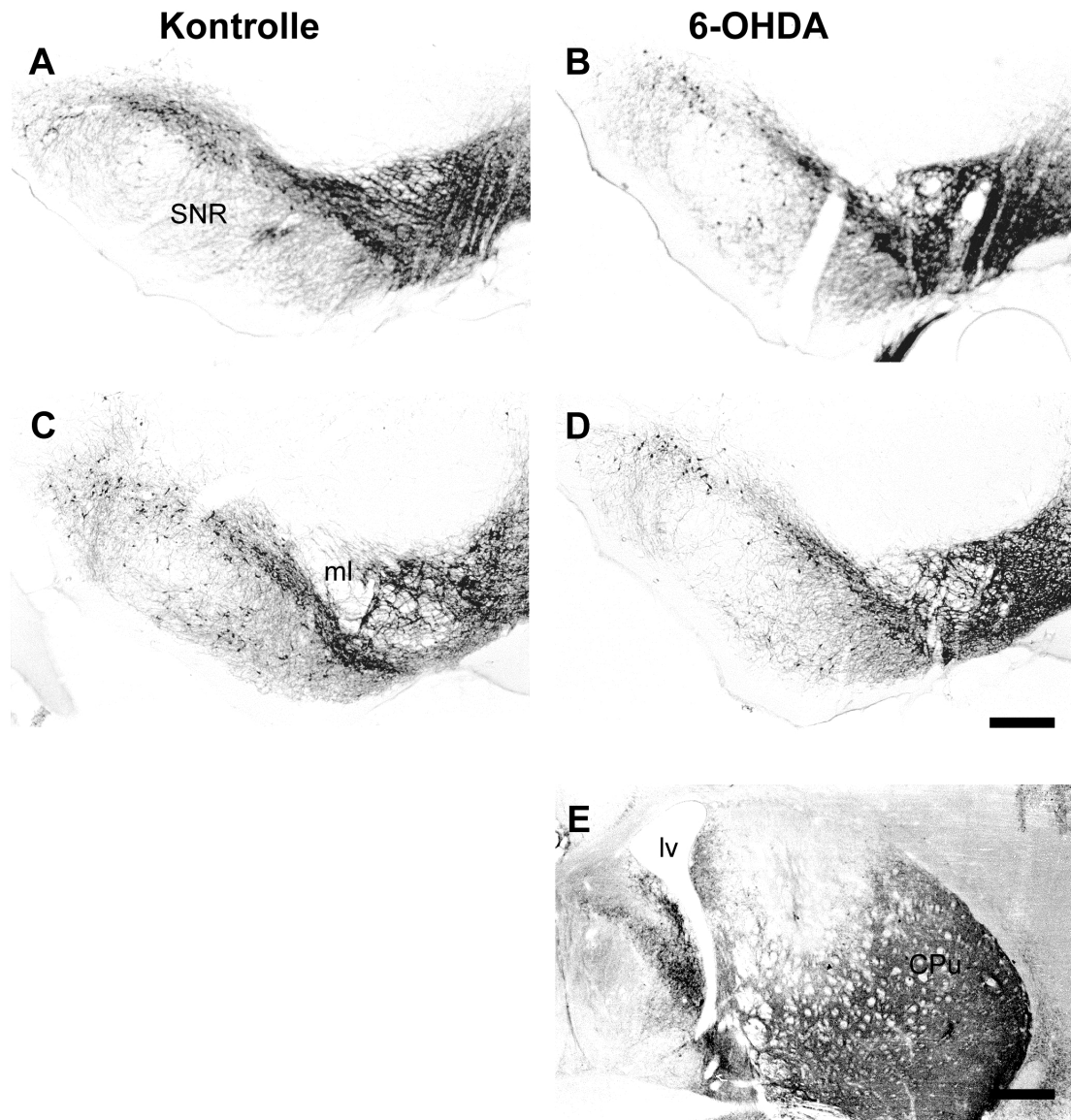


Abb. 20: Mikrophotographien koronarer Schnitte des ventralen Mesencephalons (-5.50 - -5.80 mm kaudal von Bregma) zeigen einen deutlichen Verlust TH-positiver Neurone 56 Tage nach bilateraler intrastriatärer Infusion von 6-OHDA (B, D) verglichen mit der Infusion von 0.1 % Ascorbat (A, C). Neben dem Verlust der Neurone in der SNC und VTA wird die Reduktion TH-positiver Fasern in die benachbarte SNR deutlich. Die korrespondierende Abnahme der Dichte TH-positiver Fasern im dorsalen CPU (rostro-kaudal Ebene: -0.40 mm relativ zu Bregma) (E) besteht aus einer Kernzone, mit komplettem Verlust der TH IR und einer Randzone mit mittlerer bis starker Reduktion der TH IR. lv, lateraler Ventrikel; ml, medialer Lemniskus; SNR, Substantia nigra pars reticulata. Maßstäbe = 230 μ m (A-D), 460 μ m (E).

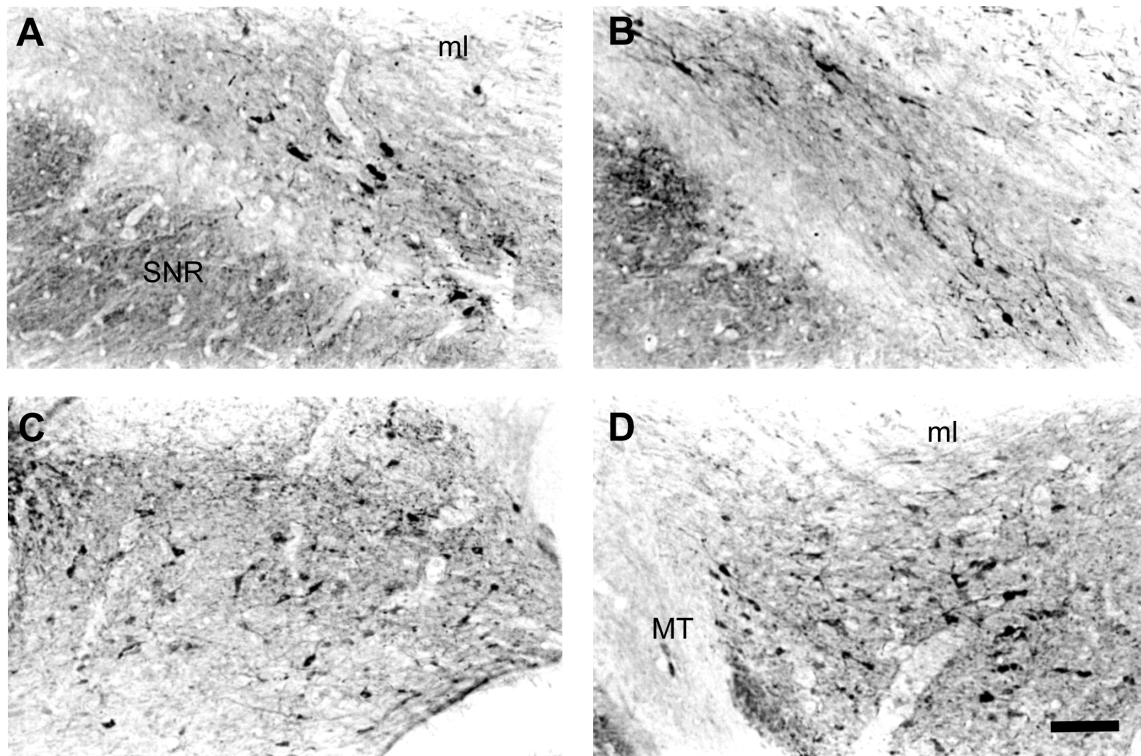


Abb. 21: Mikrophotographien koronarer Schnitte des ventralen Mesencephalons (-5.20 mm kaudal von Bregma) zeigen eine Veränderung der Anzahl Calbindin-positiver Neurone in der SNC (A, B) und im VTA (C, D) 56 Tage nach bilateraler intrastriataler Infusion von 6-OHDA (B, D) verglichen mit der Infusion von 0.1 % Ascorbat (A, C). ml, medialer Lemniskus; MT, Nucleus terminalis des akzessorischen optischen Systems; SNR, Substantia nigra pars reticulata. Massstab = 90 μ m.

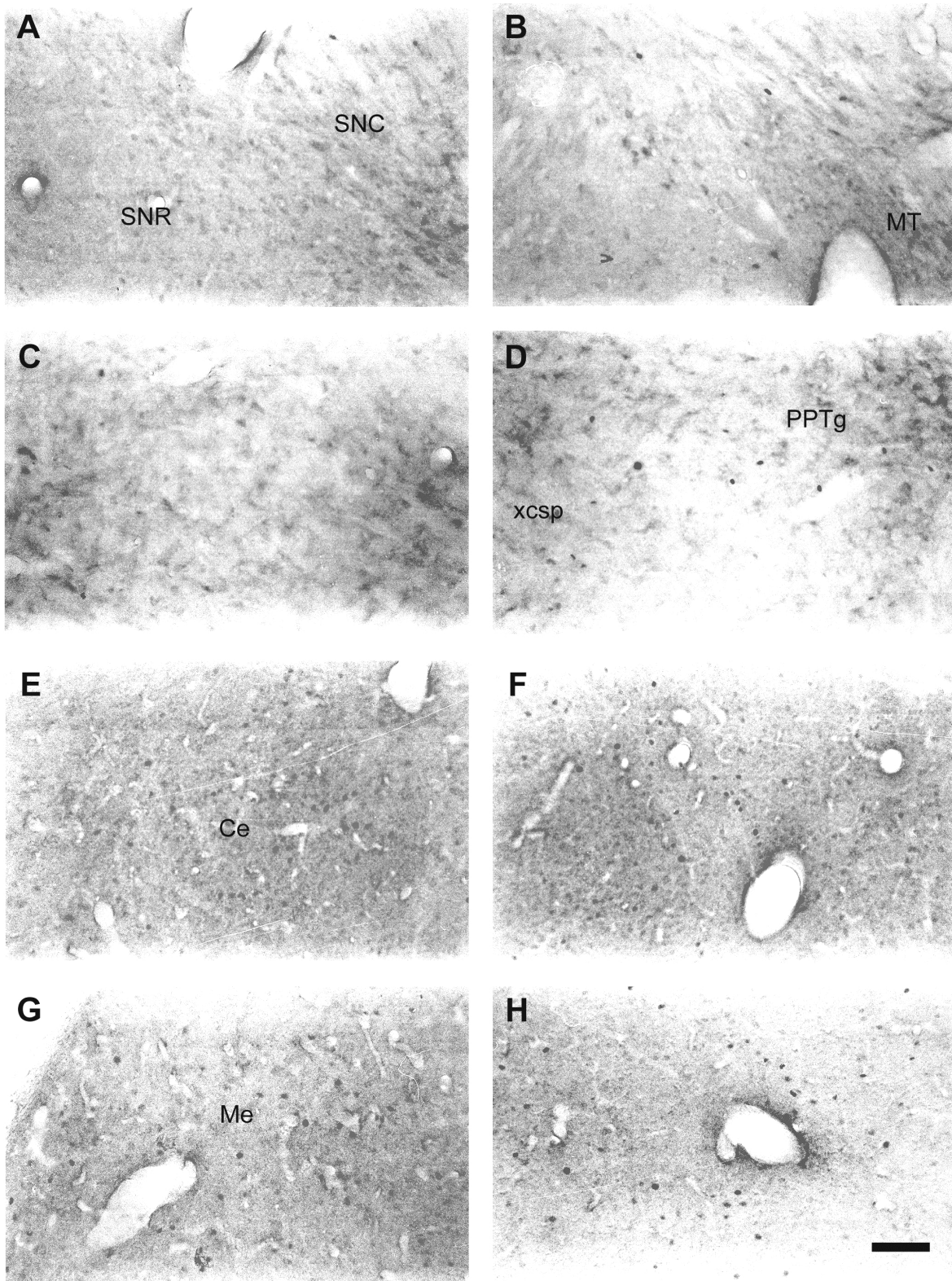


Abb. 22: Mikrophotographien koronarer Schnitte die eine Zunahme der c-Fos IR in der SNC (A, B), dem PPTg (C, D), sowie der Ce (E, F) und der Me (G, H) 56 Tage nach bilateraler intrastriatärer Infusion von 6-OHDA (B, D, F, H) verglichen mit der Infusion von 0.1 % Ascorbat (A, C, E, G) zeigen. Ce, Corpus amygdaloideum nucleus centralis; Me, Corpus amygdaloideum nucleus medialis; MT, Nucleus terminalis des akzessorischen optischen Systems; PPTg, Nucleus tegmentalis pedunculo-pontinus; SNC, Substantia nigra pars compacta; SNR, Substantia nigra pars reticulata, xcsp, Kreuzung des Pedunculus cerebellaris superior. Massstab = 90 μ m.

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die bilaterale intrastriatale Injektion von 6-OHDA führte zu einer robusten Zunahme der spontanen Katalepsie, mit einer progredienten Zunahme im Zeitraum von 56 Tagen; im Gegensatz dazu konnte eine Schwellendosierung Haloperidol keine erhöhte Katalepsie nach 6-OHDA-Läsion deutlich machen.
2. Die 6-OHDA-Läsion bewirkte eine kontinuierliche Abnahme der Lokomotion und vertikalen Exploration, sowie eine Zunahme der Immobilität im Zeitverlauf von 56 Tagen.
3. Die bilaterale intrastriatale 6-OHDA-Läsion führte zu einer DA-Entleerung von 50 % im dorsalen CPu mit einer geringen Zunahme des DA-Metabolismus (HVA/DA); im Acb und mPFC hatte die 6-OHDA-Läsion keine Auswirkung auf die Gewebegehalte der biogenen Amine und deren Metaboliten.
4. Korrespondierend dazu führte die intrastriatale 6-OHDA-Läsion auf histologischer Ebene zu einem Verlust TH-positiver Neurone in der SNC und im VTA (~ 50 %). Pathomorphologische Veränderungen und der Nachweis von DNA-Fragmentation in verbleibenden SNC Neuronen deuten auf anhaltende chronische, degenerative Prozesse 56 Tage nach Läsion hin.
5. 56 Tage nach 6-OHDA-Läsion war die Anzahl der CB-positiven Neurone in der SNC und im VTA erhöht.
6. 56 Tage nach bilateraler intrastriataler 6-OHDA-Läsion konnte eine vermehrte Expression der iTFs c-Fos und c-Jun in den Eingangsstrukturen (CPu, Acb) der dorsalen Abb.23A) und ventralen Basalganglienschleifen beobachtet werden (Abb.23B). Weiterhin konnte eine anhaltende Induktion von c-Fos und c-Jun in der SNC nachgewiesen werden. c-Fos war chronisch nach 6-OHDA-Läsion im PPTg (Abb.23A) und im medialen EA Komplex erhöht (Abb.23B).

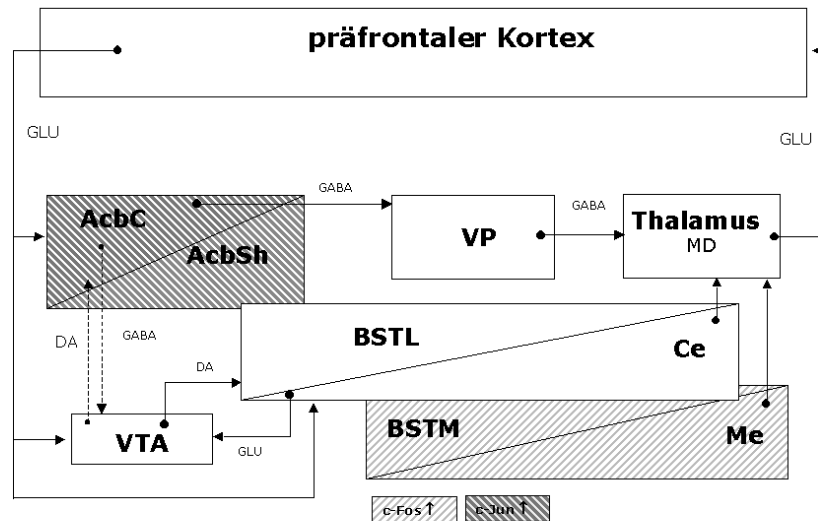
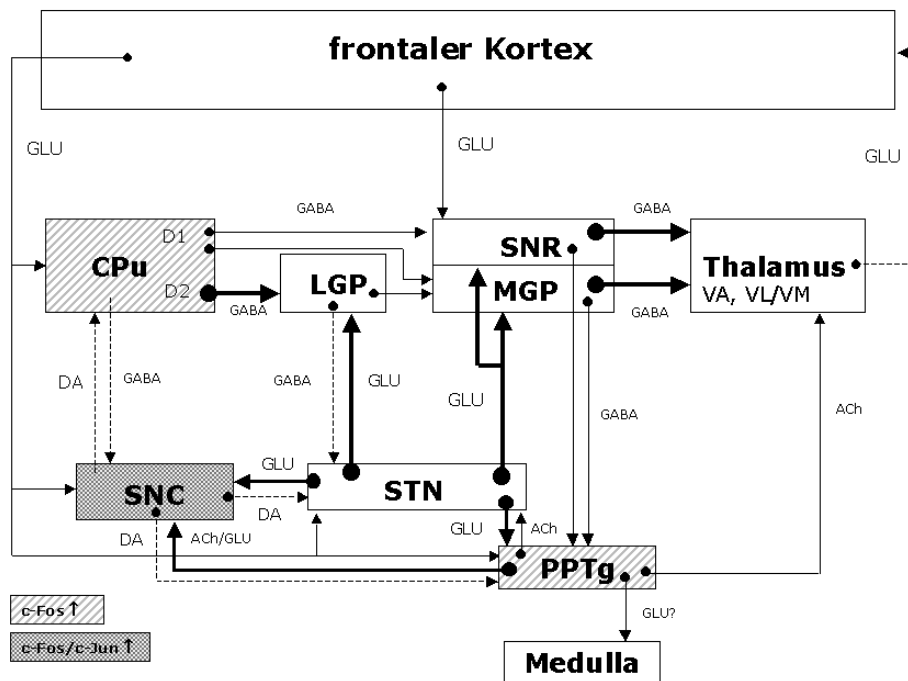


Abb. 23: Zusammenfassende Darstellung der Nettoinduktionen der iTFs c-Fos und c-Jun in der dorsalen und ventralen Schleife der Basalganglien 56 Tage nach bilateraler intrastriatraler 6-OHDA Injektion. Acbc, Nucleus accumbens core Region; Acbsh, Nucleus accumbens shell region; BSTL/M, Nucleus interstitialis striae terminalis laterale/mediale Division; Ce/Me, Corpus amygdaloideum nucleus centralis/medialis; CPu, Nucleus caudatus/Putamen; LGP, Globus pallidus pars lateralis; MD; Nucleus mediodorsalis thalami; MGP, Globus pallidus pars medialis; PPTg, Nucleus tegmentalis pedunculopontinus; SNC, Substantia nigra pars compacta; SNR, Substantia nigra pars reticulata; STN, Nucleus subthalamicus; VP, Pallidum ventrale; VA/VL/VM, Nucleus ventroanterior/ventrolateralis/ventromedialis thalami; ACh, Acetylcholin; DA, Dopamin; GABA, γ-Aminobuttersäure; GLU, Glutamat; Dicke Pfeile: Überaktivität; gestrichelte Pfeile: Unteraktivität (nach Pedersen und Schmidt, 2000a; Schmidt et al., 1992, ergänzt nach Alheid et al., 1995; Alheid und Heimer, 1988).

4.5. Diskussion

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine bilaterale Injektion des Neurotoxins 6-OHDA in das dorsomediale CPu der Ratte progressive spontane Verhaltensdefizite auslösen kann, hervorgerufen durch eine Degeneration DAerger Neurone der SNC und einem korrespondierenden Verlust der DAergen Innervation des CPu. Als mögliche Folge chronisch veränderter Transmitterbalancen konnte neben einer veränderten Expression des Ca²⁺-bindenden Proteins CB im ventralen Mesencephalon auch eine anhaltende selektive Expression der iTFs c-Fos und c-Jun in den Kerngebieten nachgewiesen werden, die von der ‚nigralen‘ und ‚extranigralen‘ Pathologie bei der Parkinson-Krankheit betroffen sind.

Entwicklung von Verhaltensdefiziten

Die vorliegenden Verhaltensexperimente zeigen, dass bereits eine partielle Läsion des mesostriatalen DA-Systems zu Störungen der normalen motorischen Aktivität führt, gemessen an der Entwicklung spontaner Katalepsie und der Abnahme der Spontanaktivität (Vorwärtslokomotion, Exploration). Diese Befunde werden durch eine umfassende tierexperimentelle Studie unterstützt, die zeigte, dass bilaterale intrastriatale 6-OHDA Injektionen im Zeitraum von 3 Monaten die ganze Bandbreite der Parkinson-Symptome wie Akinese, Rigor, Tremor und auch kognitive (visuell-räumliche) Defizite bei der Ratte auslösen kann (Lindner et al., 1999). Spontane Messungen der Hebeldruckrate in einem operanten Verhaltenstest (Bewegungsinitiation), und der Fähigkeit zur Haltungskorrektur in einem ‚forelimb adjustment‘ Test (Rigor) zeigten ein ausgeprägtes Defizit in den jeweiligen Verhaltensantworten. Darüberhinaus war die Leistung des Langzeitgedächtnis im Morris-Wasser-Labyrinth bereits eine Woche nach der Läsion beeinträchtigt, die Fähigkeit zur Abspeicherung von visueller-räumlicher Information erst 12 Wochen nach der Läsion. Diese Verhaltensdefizite waren mit einem substantiellen Verlust DAerger Neurone (79 %) in der SNC, sowie einer dorsostriatalen DA-Entleerung von 77 % verbunden. Der DA-Gehalt im PFC war unverändert, so dass die beobachteten kognitiven Defizite durch den dorsostriatalen DA-Verlust erklärt werden konnten (Lindner et al., 1999). Wenige weitere Studien zeigen, dass eine partielle bilaterale striatale DA-Entleerung anhaltende Defizite sowohl in einem einfachen belohnten Hebeldruck-Test (Lindner et al., 1997), als auch in einem konditionierten Reaktionszeittest, der komplexere, sensorimotorische Koordination erfordert (Amalric et al., 1995; Amalric und Koob, 1987), auslöst. Das Ausmass der Verhaltensdefizite war jeweils mit dem Verlust der dorsostriatalen DA-Innervation korreliert; eine partielle Entleerung (< 70 %) insbesondere des dorsolateralen CPu induzierte nur Defizite in der Bewegungsinitiation (verspätete Reaktion auf den Lichtreiz) (Amalric et al., 1995; Lindner et al., 1997), ausgedehntere Läsionen (> 70 %) des gesamten dorsomedialen CPu führten dagegen zu motorischen und kognitiven Defiziten (Aufmerksamkeitsverluste, Störung der Reiz-Antwort-Assoziation) (Amalric et al., 1995). In Übereinstimmung mit diesen bisherigen Studien zeigen die vorliegenden Verhaltensexperimente, dass bereits eine partielle DA-Entleerung (50 %) des dorsomedialen CPu subtile motorische Defizite erzeugen kann, die den Tieren im Haltungskäfig nicht anzusehen sind. Die deutliche Abnahme des Aufrichtens im ‚open field‘ drückt zum einen die allgemeine Reduktion der Spontanaktivität

aus, sie mag aber auch Folge einer Haltungsinstabilität und einer sensorimotorischen Störung im gezielten Einsetzen der Vorderpfoten sein und somit die Defizite von Parkinson Patienten bei der Anpassung der Körperstellung während einer fortlaufenden Bewegung reflektieren (Johnston et al., 1999).

Interessanterweise kann eine zusätzliche pharmakologische Inhibition der DA-Transmission durch Blockade postsynaptischer DA D2-Rezeptoren mit Haloperidol zu einem Zeitpunkt, an dem die spontanen Defizite bereits ausgeprägt sind, keine weitere Verstärkung der Katalepsie hervorrufen. Dieser Befund würde zunächst gegen die postulierte DA-Rezeptor Supersensitivität sprechen, allerdings zeigte eine verhaltenspharmakologische Untersuchung, dass partiell 6-OHDA-lädierte Ratten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Apomorphin-induzierter Schnüffelstereotypie zeigen, aber keine Verstärkung der Haloperidol-induzierten Katalepsie (Johnson et al., 1993). Dies legt den Schluss nahe, dass spontane Messungen des Verhaltensparameters Katalepsie sensibler für striatale DA-Verluste sind, als die Neuroleptika-induzierte Katalepsie. Zusammen mit den angeführten Studien zeigen die hier erhobenen Daten, dass das Tiermodell der partiellen bilateralen, intrastriatalen 6-OHDA-Läsion über eine ‚face‘ Validität für motorische und kognitive Abnormalitäten verfügt, die einem frühen Stadium der Parkinson-Krankheit entsprechen.

Die kontinuierliche Zunahme der Katalepsie im Zeitverlauf von 8 Wochen weist zunächst auf eine Progredienz der striatalen DA-Defizite hin (Sanberg et al., 1988; Schmidt et al., 1992), und bringt somit funktionell die progressive Degeneration nigrostriataler DAerger Neurone nach Läsion der Terminalen mit 6-OHDA (Sauer und Oertel, 1994) zum Ausdruck. Da Akinese nicht nur durch eine Unterfunktion der DAergen Transmission erzeugt wird, sondern auch an eine tonische GLU-Überaktivität im Striatum gebunden ist (Schmidt, 2000; Schmidt und Kretschmer, 1997), ist es vorstellbar, dass die robuste Zunahme der Katalepsie nicht nur durch die Degeneration des nigrostriatalen DA-Systems, sondern durch eine funktionell überaktive GLUerge kortikostriatale Projektion vermittelt wird.

Die Zunahme der spontanen Katalepsie auch bei den Kontrolltieren während wiederholten Testens ist wahrscheinlich das Ergebnis eines kontextabhängigen Lernprozess (‚experience-induced catalepsy‘, Sanberg et al., 1988). Diese Beobachtung wird unterstützt durch vorangegangene Experimente, die eine klare Kontext-Konditionierung der Katalepsie zeigten (Schmidt et al., 1999; Tzschentke und Schmidt, 1998).

‚Primäre‘ neurodegenerative Prozesse im ventralen Mesencephalon

Die histologische Analyse DAerger Neurone im ventralen Mesencephalon zeigt einen mittelschweren Zellverlust (50 %) TH-positiver Neurone in der SNC und dem VTA nach der Injektion von 14 µg 6-OHDA pro Striatum. Lee und Kollegen zeigen ähnliche Verluste von TH-Neuronen (47 % vs. kontralaterale Seite) 56 Tage nach der unilateralen intrastriatalen Injektion von 12 µg 6-OHDA, die linear korrelierte mit der Abnahme des striatalen DA-Gehalts (54 % vs. kontralaterale Seite) (Lee et al., 1996). Da vorangegangene Arbeiten mit Hilfe retrograder neuroanatomischer Markierung gezeigt haben, dass es sich bei dem Verlust TH-positiver Neurone nach intrastriataler 6-OHDA Injektion nicht um eine 6-OHDA-bedingte Herabregulation des TH Proteins handelt (Sauer und Oertel, 1994), ist davon auszugehen, dass die gemessenen Neuronenverluste Anzeichen einer chronisch progredienten, retrograden transneuronalen Degeneration sind. Anhaltende Zellatrophie, die zunächst während der ersten 2 Wochen des Degenerationsprozess stark zunimmt (Sauer

und Oertel, 1994) und sich dann in den nächsten Wochen bis Monaten auf einem weniger ausgeprägten Niveau manifestiert (Lee et al., 1996; Sauer und Oertel, 1994), unterstreicht den chronischen Charakter der Degeneration. Die zelluläre Atrophie stellt demnach eine pathomorphologische Veränderung dar, die dem eigentlichen Zelltod vorangeht (Lee et al., 1996; Sauer und Oertel, 1994). Ultrastrukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Teil der verbleibenden TH-positiven Neurone der SNC ‚aufgelöste‘ Zellkörper aufweisen, mit einem auffallenden Verlust von Zellorganellen und einer undeutlichen Kernmembran, wobei die TH IR in solcherart veränderten Zellkörpern kaum noch nachweisbar war (Ichitani et al., 1994). Diese Befunde deuten auf zwei Phasen bei der retrograden Degeneration hin: (i) eine akute Phase (bis zu 4 Wochen), in der der Neuronenverlust in der SNC als Folge der Zerstörung DAerger Terminalen schnell voranschreitet (Kirik et al., 1998) und (ii) eine chronische Degenerationsphase, in der möglicherweise Neurone mit weniger stark geschädigten Terminalen zunächst einem ‚Funktionsverlust‘ (Verlust der TH IR) unterliegen, bevor sie degenerieren. 8 Wochen nach der bilateralen intrastriatalen 6-OHDA Injektion zeigen sich sowohl Zellatrophie als auch ‚aufgelöste‘ Zellkörper (Reduktion der Nissl-Substanz und der Kernkompartimentierung) in der SNC, als Anzeichen langsam voranschreitender Degeneration, was zusätzlich durch den Nachweis weniger Zellkerne mit DNA-Fragmentation unterstützt wird. Ob diese morphologischen Veränderungen Teil eines apoptotischen oder nekrotischen Zelltods sind, lässt sich aufgrund der hier erhobenen Daten nicht beurteilen. Es wurde gezeigt, dass 6-OHDA *in vitro* in PC12 Zellen und DAergen Neuronen apoptotischen Zelltod auslösen kann, der zur Bildung von ROS führte (Choi et al., 1999) und abhängig von der Aktivierung von Caspase-3 (Ochu et al., 1998) war. *In vivo* Studien zeigten, dass intrastriatale 6-OHDA Injektionen bis zum postnatalen Tag 42 Apoptose, gemessen an apoptose-spezifischen morphologischen Veränderungen, in der SNC von Ratten auslösen können (Marti et al., 1997). Ebenso induzieren MFB Läsionen und auch intrastriatale 6-OHDA Injektionen DNA-Fragmentationen innerhalb von 14 Tagen in der SNC von adulten Ratten (He et al., 2000a; Marti et al., 2000). Im Gegensatz dazu fanden sich keine apoptose-relevanten morphologischen Veränderungen nach der intranigralen Injektion von 6-OHDA im adulten Tier (Jeon et al., 1995). Auf der Grundlage des bisherigen Erkenntnisstands ist ein apoptotischer Zelltod als Folge der 6-OHDA-induzierten retrograden transneuronalen Degeneration nicht auszuschliessen, kann aber mit der hier eingesetzten Methode nicht eindeutig gezeigt werden. Wichtiger im Hinblick auf die Relevanz dieses Degenerationsmodells für die ‚primäre‘ Pathologie der SNC bei der Parkinson-Krankheit ist der exponentielle Verlauf der Degeneration nach einer initialen Schädigung, die relativ schnell eine kritische Schwelle des Zellverlustes erreicht um zur Symptomausprägung zu führen. Dies entspricht der derzeit favorisierten Hypothese des ‚one hit‘ Modells zur neuronalen Degeneration bei der Parkinson-Krankheit (Clarke et al., 2000). Hiernach setzt der pathologische Verlust DAerger Neurone erst recht spät im Verlauf des normalen Alterungsprozess ein, ausgelöst durch *das* schädigende Ereignis, führt dann aber bereits nach wenigen Jahren zur Ausprägung der Parkinson-Symptome (Clarke et al., 2000; Dunnett und Björklund, 1999). Im Zusammenhang mit der Feststellung, dass bereits partielle striatale DA-Entleerungen aufgrund einer subtotalen SNC Degeneration zu funktionellen Defiziten führen, erscheint das hier eingesetzte Tiermodell der intrastriatalen 6-OHDA-Läsion geeignet, mögliche neuroprotektive Behandlungsstrategien zu untersuchen.

Selektive Vulnerabilität und kompensatorische Mechanismen im ventralen Mesencephalon

Die vorliegende histologische Untersuchung zeigt eine Zunahme der CB-positiven Neurone in der SNC und im VTA. Obwohl keine Doppelfärbungen gegen TH durchgeführt wurden, zeigen die CB-positiven Neurone eine den TH-positiven Neuronen gleichende Morphologie, wenn auch insgesamt weniger Neurone CB-positiv sind. Dies wird unterstützt durch eine neuroanatomische Studie, die diese überlappende Morphologie zeigte (McRitchie et al., 1996). Bei der Ratte sind etwa 14 % der DAergen Neurone in der SNC CB-positiv, im VTA sind es ca. 30 % (Nemoto et al., 1999). CB-positive, nicht-DAerge Neurone wurden in dieser immunhistochemischen Untersuchung nicht nachgewiesen (Nemoto et al., 1999), umfassen aber im ventralen Mesencephalon der Maus eine vernachlässigbare Subpopulation (Liang et al., 1996). Der kombinierte Einsatz von anterogradem Axontracing mit *Phaseolus vulgaris*-Leucagglutinin und immunhistochemischer Doppelfärbung gegen TH und CB hat gezeigt, dass mesostriatale Projektionen in das Matrix Kompartiment den CB-positiven Neuronen des dorsalen Bandes des ventralen Mesencephalon entspringen, die CB-negativen DAergen Neurone des ventralen Bandes hingegen in das striatale Striosom Kompartiment projizieren (Gerfen et al., 1987a; Gerfen et al., 1987b). Diese neuroanatomischen Arbeiten lassen den Schluss zu, dass es sich bei den hier den gezählten Neuronen um DAerge, CB-positive mesostriatale Projektionsneurone handelt, im Gegensatz zu den kleineren, sternförmigen nicht-DAergen Interneuronen. Demnach induziert die retrograde Degeneration der mesostriatalen DAergen Neurone innerhalb von 8 Wochen eine Aufregulation von CB in einem Teil der überlebenden Neurone.

Bisherige Befunde zur Rolle von CaBPs im degenerierenden mesostriatalen DA-System lassen keinen unmittelbaren Schluss über eine mögliche neuroprotektive Wirkung zu. Eine ähnliche Zunahme CB-positiver DAerger Neurone in der SNC –jedoch nicht im VTA– konnte 21 Tage nach unilateraler MFB Läsion mit 6-OHDA gezeigt werden (Tan et al., 1999), wobei der allgemeine Zellverlust zu gross war, um von einem neuroprotektiven Effekt zu sprechen. Weiterhin zeigten sich Calretinin-positive DAerge Neurone der SNC resistenter gegenüber der chronischen Degeneration nach intrastriataler 6-OHDA-Läsion (Kim et al., 2000; Tsuboi et al., 2000), sowie der MPTP-induzierten Degeneration bei der Maus und beim Affen (German et al., 1992; Liang et al., 1996). Die akute MPTP-Behandlung induzierte eine Zunahme des CB-Gehalts in der A10 Zellgruppe (inkl. VTA) 3-6 h nach der Injektion (Ng et al., 1996). Schliesslich konnte auch in der SNC von Parkinson Patienten eine relativ verminderte Degeneration der CB-positiven catecholaminergen Mittelhirnneurone gezeigt werden (German et al., 1992; Hirsch et al., 1992). Weiterhin scheint die selektive Vulnerabilität der SNC Neurone vom umgebenden CB-haltigen Neuropil anhängig zu sein: der Neuronenverlust ist in dem CB-reichen Matrix Kompartiment geringer als in den CB-armen Taschen (Nigrosomen) der SNC (Damier et al., 1999b; Damier et al., 1999a). Dies veranlasste die Autoren zu der Vermutung, dass die Nigrosomen und Matrix Kompartimente der SNC über einen unterschiedlichen Gehalt an Wachstumsfaktoren und –rezeptoren oder auch intrazellulären Komponenten, die mit Exzitotoxizität und oxidativem Metabolismus in Verbindung stehen, verfügen (Damier et al., 1999b).

Interessanterweise zeigte eine andere Studie, dass der Gehalt an CB-Protein und mRNA spezifisch in den Gehirnregionen von Parkinson Patienten reduziert ist, die von der Neurodegeneration am stärksten betroffen sind, wie SNC, Nucleus Raphe dorsalis und

Hippokampus (Iacopino und Christakos, 1990). Diese Befunde lassen natürlich keine Aussage darüber zu, ob die Abnahme von CB eine Folge der Neurodegeneration ist, oder eine verminderte CB Expression die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Ca^{2+} -Homeostase oder die Ca^{2+} -Pufferkapazität reduziert und somit kausal zur erhöhten Vulnerabilität dieser Neurone gegenüber exzitotoxischen Prozessen beiträgt. Ebenfalls kontrovers ist der Befund, dass CB-positive Neurone des ventralen Mesencephalon bevorzugt den Acbc innervieren (Tan et al., 1999), das Kompartiment des Acb, das ähnlich wie das Matrix Kompartiment des CPU vulnerabler gegenüber der 6-OHDA- (Zahm, 1991) und MPTP-Toxizität (Turner et al., 1988) ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass DAerge Neurone mit einem hohen Gehalt an DA-Transporter mRNA stärker von der MPTP-induzierten Degeneration betroffen sind, als jene mit niedrigem, unabhängig von der Menge des exprimierten CB Proteins (Haber et al., 1995; Sanghera et al., 1997). Somit scheint es neben den CaBP weitere Faktoren zu geben, die die Vulnerabilität der mesencephalen Neurone gegenüber DAergen Neurotoxinen definiert.

Die hier gezeigte 6-OHDA-induzierte Zunahme CB-positiver Neurone kann auch als Teil der Zellkörperreaktion einzelner Neurone auf eine chronische GLUerge Überstimulation und damit einen dauerhaft erhöhten Ca^{2+} -Einstrom, vornehmlich über die ionotropen GLU-Rezeptoren, betrachtet werden. Diese Vermutung wird gestützt durch *in vitro* Experimente, die gezeigt haben, dass eine langanhaltende Stimulation von Purkinjezellen mit Kainat, AMPA oder GLU eine vermehrte CB-IR, begleitend zum Ca^{2+} -Einstrom, zur Folge hat (Batini et al., 1997). Die Überexpression von CB durch stabile Transfektion eines CB-Vektors in eine Astrozytomzelllinie schützte vor Ca^{2+} -Ionophor- und β -Amyloid-induzierter, Ca^{2+} -abhängiger Apoptose (Wernyj et al., 1999). *In vivo* induzierte ein akuter Status epilepticus durch die systemische Gabe von Kainat eine sequentielle Zellkörperreaktion im Hippokampus der Ratte: einer schnellen Aufregulation von c-fos mRNA (30 min) folgten eine vermehrte Expression von BDNF mRNA (1 h) und eine verspätete Zunahme der mRNA von CB (3 h), die sich jedoch innerhalb von 24 h wieder normalisierte (Lee et al., 1997). Auf dem Hintergrund dieser Daten scheint es möglich, dass die anhaltende Expressionen von c-Fos in der SNC 8 Wochen nach intrastriärer 6-OHDA Injektion Folge einer GLUergen Überstimulation ist, und wiederum Zellkörperreaktionen wie die Erhöhung der Ca^{2+} -Pufferkapazität zur Folge hat, die die Überlebensfähigkeit einiger Neurone sichern soll. Konsequenterweise mag das relative Überleben CB-positiver Neurone in der SNC von Parkinson Patienten und in den erwähnten tierexperimentellen Studien kein Indiz für eine phänotypisch festgelegte Vulnerabilität gegenüber der Degeneration an sich sein. Vielmehr scheint die Fähigkeit weniger Neurone ihre Ca^{2+} -Pufferkapazität an eine chronische GLUerge Überstimulation - die hier als wichtiger ätiopathologischer Faktor zugrundegelegt wird - anzupassen, ihr Überleben langfristig zu gewährleisten.

Die anhaltende Expression von c-Jun in wenigen Neuronen der SNC kann entsprechend der Überlegung, dass die hier hervorgerufene retrograde transneurone Degeneration eine Axotomie für die betroffenen Neurone darstellt, als degenerative oder regenerative Zellkörperreaktion angesehen werden (Zusammenfassung in Herdegen und Leah, 1998). Dies wurde auch von Jenkins und Kollegen vermutet, die eine anhaltende Expression von c-Jun über 14 Tage nach unilateraler intrastriärer 6-OHDA-Läsion beobachtet haben (Jenkins et al., 1993). Der hier eingesetzte monoklonale Antikörper ist spezifisch gegen das

an Ser-63 phosphorylierte c-Jun Protein, das wiederum durch die stress-aktiviert c-Jun N-terminale Kinase (JNK1) selektiv phosphoryliert wird. Da die JNKs und die anschliessende Aktivierung von c-Jun ein Teil der zellulären Stressreaktion darstellen (Herdegen und Leah, 1998) ist bei der beobachteten chronischen c-Jun Expression von einer Zellkörperreaktion auf anhaltenden degenerativen Stress auszugehen. Dieser Schluss wird dadurch gestützt, dass die 6-OHDA-induzierte Degeneration DAerger Neurone *in vitro* durch eine ROS-abhängige JNK-Aktivierung vermittelt wird (Choi et al., 1999) und ebenso die MPTP-induzierte nigrostriatale Degeneration in der Maus (Saporito et al., 2000). Darüber, ob der chronischen c-Jun Aktivierung in Neuronen der SNC eine GLUerge Überaktivität zugrunde liegt, die als Folge verzögerten Zellstress und -tod auslöst, kann hier jedoch nur spekuliert werden.

Veränderungen neuronaler Aktivitäten als Grundlage der ‚extranigralen‘ Pathologie

Dorsales und ventrales Striatum

Der immunhistochemische Nachweis der beiden iTFs c-Fos und c-Jun zeigt eine anhaltende Veränderung neuronaler Aktivitäten in Kerngebieten distal der primär von der retrograden Degeneration betroffenen Neurone. Dies lässt zunächst auf eine voranschreitende Degeneration nicht nur des mesostriatalen, sondern des gesamten mesotelencephalen DA-Systems schliessen. Möglicherweise erfahren die derart ‚markierten‘ Kerngebiete aber auch eine veränderte Transmitterbalance im Sinne der postulierten sekundären GLUergen Hyperaktivität (1.4.).

Bezugnehmend auf die funktionelle Anatomie der Basalganglien Schleifen findet sich eine ausgeprägte langanhaltende Expression der iTFs in den beiden Eingangsstrukturen der dorsalen und ventralen Basalganglien Schleife, dem dorsalen (CPu) und ventralen (Acbc/Acbsh) Striatum. Frühe Arbeiten haben gezeigt, dass sowohl die MFB Läsion mit 6-OHDA als auch die Transsektion des MFB zu einer bis zu 3 Monate anhaltenden Expression von FRAs und JunB im CPu und Acb führt, jedoch nicht von c-Fos oder c-Jun (Dragunow et al., 1991; Dragunow et al., 1995). Im CPU war die FRA-IR hauptsächlich in den striatopallidalen Ausgangsneuronen lokalisiert (Jian et al., 1993). Parallel dazu induziert der DA D2-Rezeptor-Antagonist Haloperidol eine vorübergehende Expression von c-Fos, aber eine über 3 Tage anhaltende Expression von FRAs in striatalen Neurone (Dragunow et al., 1990), was darauf hindeutet, dass die Induktion von c-Fos auf einen akuten Stimulus hin schnell aber vorübergehend erfolgt, FRAs dagegen über längere Zeit nach einem akuten Stimulus vorliegen und daher als ‚chronische‘ iTFs angesehen werden können (siehe 1.6.). Weitere Experimente haben gezeigt, dass die akute, aber transiente striatale Induktion von c-Fos Protein und mRNA nach unilateraler Injektion von 6-OHDA in das MFB oder DA D2-Rezeptor Blockade mit Haloperidol abhängig von der GLUergen Transmission im dorsalen CPu ist (Cooper et al., 1995a; Schuller und Marshall, 2000; Ziólkowska und Höllt, 1993). Die Koadministration der NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ketamin (Cooper et al., 1995b), MK-801 (Ziólkowska und Höllt, 1993) und (\pm)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-phosphonäure (CPP) sowie des AMPA-Rezeptor-Antagonisten 6,7- dinitroquinoxaline-2,3-dion (DNQX) (Schuller und Marshall, 2000) blockierte die c-Fos Induktion nach ‚DA-Entleerung‘, was die Hypothese unterstützt, dass die neuronale Aktivität striataler Projektionsneurone über ionotrope GLU-Rezeptoren beeinflusst wird. Die Disinhibition der kortikofugalen Projektion mit dem GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Picrotoxin induzierte selektiv eine NMDA-Rezeptor-abhängige c-Fos und JunB Induktion in striatopallidalen Neuronen der indirekten

Bahn (Berretta et al., 1997) und verstärkte darüberhinaus die Haloperidol-induzierte c-Fos Expression selektiv im dorsolateralen CPu (Berretta et al., 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Durchtrennung kortikofugaler Fasern die Apomorphin- und D-Amphetamin-induzierte c-Fos Expression nach unilateraler nigrostriataler Degeneration reduziert (Cenci und Björklund, 1993). Zusammengenommen stützen diese tierexperimentellen Befunde die Hypothese, dass die Veränderungen neuronaler Aktivitäten striataler Ausgangsneurone nach Verlust der DAergen Innervation entscheidend durch die tonische kortikostriatale GLU-Transmission beeinflusst wird. Da c-Fos in den hier angeführten Studien ein transientes Signal darstellte, deutet die hier beobachtete Expression von c-Fos, die noch 8 Wochen nach der initialen Schädigung des mesostriatalen DA-Systems im Vergleich zu den intakten Tieren erhöht ist, auf eine dynamische Veränderung der Transmittergleichgewichte im Striatum hin, und somit ein Signal für die Induktion von c-Fos darstellen. Die langsame chronische Degeneration der mesostriatalen DA-Neurone bildet hierbei die Grundlage für eine sekundäre relative Überfunktion der tonischen kortikalen GLUergen Afferenzen und unterstützt somit die postulierten Transmitterimbancen im dorsalen Striatum (Schmidt, 1995). Interessanterweise findet sich in beiden Subregionen des Acb keine anhaltende c-Fos Expression, dafür aber eine qualitativ erhöhte phospho-c-Jun Expression. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Stimulation von ionotropen GLU-Rezeptoren *in vitro* die Expression von c-fos und c-jun induziert (Vacarino et al., 1992), und dass eine Stimulation striataler Primärkulturen mit GLU neben der Induktion von c-Fos und c-Jun zu einer Ca^{2+} -unabhängigen Aktivierung der JNK-c-Jun-Kaskade führt die durch NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (Schwarzschild et al., 1997; Schwarzschild et al., 1999). *In vivo* löste die intrastriatale Injektion des GLU-Rezeptor-Agonisten Quinolinat eine c-Fos Expression in striatalen Projektionsneuronen aus (Aronin et al., 1991; Berretta et al., 1992), wobei die Effekte auf die Expression von c-Jun in dieser Studie nicht untersucht wurden. Die Hypothese, dass auch im Acb eine funktionelle GLUerge Überaktivität, vermittelt über ionotrope GLU-Rezeptoren einen erhöhten Zellstress für die accumbalen Neurone bedeutet und entsprechende intrazelluläre Stresskaskaden aktiviert, bleibt hier daher spekulativ, zumal sich der hier erhobene Befund aufgrund einer allgemein schwachen IR nur auf eine qualitative Auswertung stützt.

Cholinerge Hirnstammkerne

Ein weiterer wichtiger Befund, der die Vermutung unterstützt, dass auch die von der ‚extranigralen‘ Pathologie betroffenen Strukturen über eine selektive Vulnerabilität, möglicherweise aufgrund ihrer neuroanatomischen Verschaltungen verfügen, ist die anhaltende Expression von c-Fos im PPTg. Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, dass unilaterale Läsionen der SNC mit 6-OHDA zu einer erhöhten Expression der Cytochromoxidase Untereinheit I (COI) mRNA im PPTg führt (Orieux et al., 2000). Die erhöhte metabolische Aktivität betraf vornehmlich Neurone, die den STN exzitatorisch innervieren, und wird von den Autoren als möglicher GLUerger Eingang diskutiert, der zur Überaktivierung des STN bei der Parkinson-Krankheit führt (Orieux et al., 2000). Ein erhöhter Glukose Verbrauch, als Zeichen für eine erhöhte metabolische Aktivität, konnte im PPTg von unilateral intranigral 6-OHDA lädierten Ratten (Carlson et al., 1999) und MPTP-behandelten Affen nach uni- und bilateraler nigrostriataler Degeneration beobachtet werden (Mitchell et al., 1989; Palombo et al., 1990). Weiterhin konnte bei der Ratte eine erhöhte

Apomorphin-induzierte c-Fos Expression nach unilateraler MFB Läsion mit 6-OHDA im PPTg gezeigt werden, wobei dies aufgehoben wurde, wenn den Tiere vorher embryonales mesencephales Gewebe in das ipsilaterale Striatum implantiert wurde (Nakao et al., 1998) und somit die DAerge Unterfunktion ausgeglichen wurde.

Trotz dieser tierexperimentellen Befunde ist der Aktivitätsstatus des PPTg bei der Parkinson-Krankheit und damit sein Beitrag zur Symptomatik und zur progressiven Degeneration der SNC derzeit noch unklar. Vermutlicherweise befindet sich der PPTg im Verlaufe der chronischen Erkrankung in zwei Aktivitätszuständen: (i) einem frühen überaktiven, ‚kompensierten‘ Zustand, den auch die Tiermodelle simulieren, und (ii) einem späten klinischen ‚dekompensierten‘ Zustand, in dem er womöglich selbst von der Degeneration betroffen ist (Hirsch et al., 1987; Jellinger, 1991; Zweig et al., 1989). Abb. 23A zeigt einen hyperaktiven PPTg -gemessen an der anhaltenden c-Fos Expression- eingebunden in den DA-denervierten Zustand der motorischen Basalganglien Schleife. Die anhaltende c-Fos Expression im PPTg wird vermutlich durch eine GLUerge Stimulation eines chronisch Überaktiven STN angetrieben sein. Ein überaktiver PPTg wird zunächst die verbliebenen SNC Neurone verstärkt cholinerg und auch GLUerg (Lavoie und Parent, 1994) stimulieren, um somit den striatalen DA-Verlust zu kompensieren (Lokwan et al., 1999). Die GLUerge Komponente der pedunculopontinonigralen Projektion stellt aber höchstwahrscheinlich neben der überaktiven subthalamonigralen GLUergen Projektion eine weitere Quelle für die postulierte exzitatorische Überregung dar, die zur chronischen Degeneration der SNC Neurone führt. Somit kann der kompensatorisch überaktive PPTg zur ‚nigralen‘ Pathologie beitragen. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass die Degeneration der SNC im MPTP-behandelten Affen durch eine vorangegangene unilaterale Läsion des PPTg mit Kainat stark vermindert wird (Takada et al., 2000). Interessanterweise konnte im MPTP-behandelten Affen trotz schwerer Verluste der DAerge Neurone keine Neurodegeneration im PPTg beobachtet werden, so dass die Degeneration der cholinergen Neurone des PPTg bei Parkinson Patienten vermutlich eher ein Phänomen des Endzustandes der Erkrankung ist, unabhängig von der ‚nigralen‘ Pathologie (Herrero et al., 1993).

Der Beitrag, den der PPTg zur Parkinson-Symptomatik leistet wird abhängig von seinen Aktivierungszuständen diskutiert. Im ‚kompensierten‘ Zustand, wird er wahrscheinlich den bereits überaktiven STN durch die erregende, reziproke Verschaltung (Lavoie und Parent, 1994) weiter verstärken (Orieux et al., 2000) und somit zur GLU-bedingten Manifestation der Symptome beitragen (Schmidt, 2000; Starr et al., 1997). Dies wird ebenfalls dadurch unterstützt, dass PPTg Läsionen die motorischen Defizite der MPTP-behandelten Affen reduzierten (Takada et al., 2000). Im Verlauf der fortgeschrittenen Erkrankung scheint ein dysfunktioneller ‚dekompensierter‘ PPTg entscheidend zur Akinese sowie Gang- und Haltungstörungen, die durch DAerge Therapie nur gering verbessert werden, beizutragen (Pahapill und Lozano, 2000). Hierbei wird angenommen, dass die inhibitorischen Afferenzen der Basalganglien Ausgangskerne MGP/SNR den PPTg verstärkt inhibieren, was wiederum zu einer verminderten Bahnung der Kerne in der *Formatio reticularis* und in Folge einer abnormalen Aktivität der Motorneurone im Rückenmark führt. Diese können folglich auf motorische Befehle aus dem Kortex nicht adäquat -im Sinne einer Bewegungsinitiation- reagieren (Delwaide et al., 2000). Mit dieser Hypothese liesse sich auch die beobachtete Degeneration des PPTg vereinbaren, wodurch ebenfalls eine verminderte Bahnung der

reticulären Neurone entstehen würde. Auf der Grundlage der hier diskutierten experimentellen und klinischen Befunde kommt dem PPTg sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Parkinson-Krankheit zu und macht ihn im Hinblick auf anti-GLUerge therapeutische und protektive Strategien neben dem STN zu einem wichtigen Basalganglien-assoziierten Kerngebiet.

„Extended Amygdala“

„Extranigrale“ Veränderungen, gemessen an einer anhaltenden Expression von c-Fos nach intrastriatler 6-OHDA-Läsion, betreffen auch limbische Strukturen, hier besonders die Kerne des medialen EA Komplex mit dem BSTM und dem Me. Unter dem Aspekt, dass die Parkinson-spezifischen Läsionsmuster auch Teile des limbischen Systems wie die Subregionen der Amygdala und den BST umfassen (Braak und Braak, 2000; Mattila et al., 1999), mag die c-Fos Expression bereits Teil einer veränderten neuronalen Aktivität sein, die chronisch zu Veränderungen des Zytoskeletts und auch Degeneration führt. Diese Beobachtung wird prinzipiell dadurch gestützt, dass bilaterale intranigrale 6-OHDA Injektionen zu einer akuten (bis 24 h) erhöhten Expression von c-Fos in Kernen der EA führte (Pedersen und Schmidt, 2000b). Aufgrund der derzeitigen Datenlage über die Interaktion der DAergen und GLUergen Transmission in den Kernen der EA, können hier nur Vermutungen über die verantwortlichen Mechanismen, wie z.B. eine veränderte Transmitterbalance, angestellt werden. Es wurde gezeigt, dass der DA D1-Rezeptor-Agonist SKF 38393, nicht aber der D2-Rezeptor-Antagonist Sulpirid im Me akut c-Fos induziert (Radulovic et al., 2000). Im Vergleich dazu hatte NMDA allein keine Effekte auf die c-Fos Expression im Me, reduzierte aber die SKF 38393-induzierte c-Fos Expression. Zwischen Sulpirid und NMDA konnte keine Interaktion festgestellt werden, allerdings reduzierte Sulpirid die SKF 38393-induzierte c-Fos Expression im Me (Radulovic et al., 2000). Ähnlich wie im CPu trieb im Me eine D1-Rezeptorstimulation die NMDA-Rezeptor-vermittelte c-Fos Expression an, allerdings scheint es im Gegensatz zum CPu keine Interaktion mit DA D2-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren zu geben. Die moderate DAerge Innervation des Me aus dem Mesencephalon (Björklund und Lindvall, 1984; Weiner et al., 1991) und die Tatsache, dass ebenfalls nur geringe Mengen an DA D1-Rezeptor mRNA und keine D2-Rezeptor mRNA (Wamsley et al., 1989; Weiner et al., 1991) im Me nachgewiesen wurde, könnte die ausbleibende c-Fos Aktivierung im Me nach Sulpirid erklären. Gleichzeitig deuten diese neuroanatomischen Grundlagen darauf hin, dass die anhaltende Induktion von c-Fos nicht einfach durch eine verminderte DAerge Innervation und GLUerge Überaktivität im Me erklärt werden kann. Der mediale EA Komplex stellt ein neuroanatomisches Kontinuum dar, gebildet aus dem BSTM am rostromedialen Ende und dem Me am kaudomedialen Ende (Alheid et al., 1995; Alheid und Heimer, 1988), in dem die Information durch „feedback“ Verschaltung prozessiert wird. Der BSTM erhält eine ausgeprägte DAerge Innervation aus der SNC und dem VTA (Björklund und Lindvall, 1984) und wird somit in Folge der chronischen Degeneration des mesotelencephalen DA-Systems eine gewisse DA-Hypofunktion erfahren. Es ist bis jetzt spekulativ, ob die anhaltende c-Fos Induktion im BSTM als eine erhöhte neuronale Aktivität in Folge einer funktionellen GLUergen Überaktivität, entsprechend dem dorsalen CPu, anzusehen ist. Die Vergleichbarkeit der funktionellen Neuroanatomie des EA System mit dem striatopallidalen „feedback“ System, sowie die beteiligten Neuronentypen, (medium-sized spiny I Projektionsneurone) (Alheid

und Heimer, 1988) lassen jedoch die Vermutung zu, dass auch ähnliche Interaktionen der beteiligten Transmittersystem vorliegen. Ebenso spekulativ nach dem derzeitigen Erkenntnisstand ist die Überlegung, dass eine chronische Aktivierung von c-Fos zu den zytoskeletalen Veränderungen und zur Bildung von Lewy Körper und Neuriten führt. Auffällig erscheint jedoch die Parallele zwischen der Pathoanatomie in der Parkinson-Krankheit (BST und Amygdala stark betroffen) (Braak et al., 1996; Braak et al., 2000b) und den selektiven Aktivierungsmustern nach bilateraler Läsion des mesotelencephalen DA-Systems.

Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass eine partielle bilaterale Läsionen des mesostriatalen DA-Systems ein geeignetes Tiermodell für präklinische bis frühe klinische Stadien der Parkinson-Krankheit darstellt. Die robusten Verhaltensdefizite sowie die langsame, progrediente Degeneration der DAergen Neurone im Mesencephalon charakterisieren die ‚primäre‘ Pathologie der SNC und verleihen dem Tiermodell eine konstruktive und ‚face‘ Validität hinsichtlich der Pathologie und Symptomatik der Parkinson-Krankheit. Die Beobachtung, dass auch das Phänomen der ‚extranigralen‘ Pathologie ebenfalls, selektiv in Kernen der Basalganglien Schleifen, im cholinergen Hirnstamm und im limbischen System simulierte werden kann, unterstreicht die Validität des Modells und macht es zu einem ‚cross species‘ Modell der neuropathologischen Veränderungen bei der Parkinson-Krankheit. Da symptomatische und möglicherweise auch neuroprotektive Strategien, die entweder auf einer Wiederherstellung der DAergen Transmission oder einer anti-GLUergen Wirkung beruhen, vermutlicherweise am effektivsten in einem frühen Stadium der Erkrankung einzusetzen sind, stellt die partielle bilaterale striatonigrale Degeneration ein geeignetes Tiermodell zu deren Untersuchung dar.

5. Wirkung von Dopamin D2-Rezeptor-Agonisten auf die neurodegenerativen Effekte der 6-OHDA-Läsion

5.1. Einführung

Die DA-Substitutionstherapie mit L-DOPA stellt nach wie vor die effizienteste und am weitesten verbreitete Symptombehandlung der Parkinson-Krankheit dar (Cotzias et al., 1969; Jenner, 2000; Yahr et al., 1969), insbesondere Akinese und Rigor können in frühen bis mittleren Stadien der Erkrankung aufgehoben werden können (Dunnett und Björklund, 1999). Etwa 70 - 75 % der Parkinson Patienten entwickeln jedoch innerhalb der ersten 5 Jahre nach Behandlungsbeginn schwere motorische Störungen (Inzidenz: 10 % pro Jahr nach Beginn der Medikation (Baas, 2000). Dies sind vornehmlich Dyskinesien, die sich in choreatischen oder dystonen Bewegung der Extremitäten oder der Gesichtsmuskulatur und Stereotypien äussern (Baas, 2000). Das Auftreten der L-DOPA-induzierten Dyskinesien (LID) oder genereller DA-Mimetika induzierte Dyskinesien (DID) ist höchstwahrscheinlich abhängig von der voranschreitenden Degeneration des DAergen Systems (Hagan et al., 1997; Obeso et al., 2000b) limitiert jedoch das therapeutische Spektrum der L-DOPA Therapie entscheidend (Grandas et al., 1999). Die Kombinationstherapie von L-DOPA mit direkten DA-Rezeptor-Agonisten wie Apomorphin (Agid et al., 1979), Pergolid (LeWitt et al., 1983a), Bromocriptine (Przuntek et al., 1996; Reader und Dewar, 1999), Lisurid (Parkes et al., 1981; Rinne, 1999), Ropinirol (Rascol et al., 2000) und Cabergolin (Lera et al., 1993; Rinne et al., 1997) kann den Beginn der Dyskinesien verzögern. Ebenso zeigen klinischen Studien, dass die *de novo* Behandlung mit Bromocriptine oder Lisurid die Inzidenz für Dyskinesien reduziert (Lees und Stern, 1981; Montastruc et al., 1989).

Im Tiermodell kann eine chronische L-DOPA Medikation von MPTP-behandelten Affen ein dyskinetisches Syndrom auslösen, das dem der Parkinson Patienten entspricht (Bedard et al., 1986; Pearce et al., 1995). Ratten mit unilateraler 6-OHDA-Läsion des mesostriatalen DA-Systems zeigen nach chronischer L-DOPA Behandlung eine verstärkte motorische Verhaltensantwort, insbesondere beim DA-Agonisten-induzierten Rotationsverhalten (siehe 1.7.4.) (Carey, 1991), aber auch ‚abnormal involuntary movements‘ (AIMs), ein pathologisches Verhaltensmuster ähnlich den Dyskinesien (Andersson et al., 1999; Cenci et al., 1999).

Die pathophysiologischen und biochemischen Veränderungen die der DID zugrunde liegen sind bisher nicht aufgeklärt. Bisläng konnte keine einfache Korrelation zwischen einer Veränderung der striatalen DA D1- und/oder D2-Rezeptordichte und dem Auftreten von DIDs bei Parkinson Patienten (Turjanski et al., 1997) oder MPTP-behandelten Affen nachgewiesen werden (Zusammenfassungen in Bedard et al., 1999; Calon et al., 2000a; Jenner, 2000). Vielmehr scheinen komplexe Veränderung striataler Projektionswege und damit ein veränderter funktioneller Status der Basalganglien, der sich von der Physiologie des normalen oder DA-denervierten Tieres unterscheidet, zur Entstehung der DIDs beizutragen (Calon et al., 2000a; Chase et al., 1993; Engber et al., 1991). Zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl Veränderungen im Gehalt an kolokalisierten Neuropeptiden in den striatalen Projektionsneuronen (Cenci et al., 1998; Chritin et al., 1993; Engber et al., 1991; Gerfen et al., 1990; Henry et al., 1999; Jenner, 2000), als

auch Veränderungen in der GABAergen und GLUergen Transmission im Striatum und den Ausgangsstrukturen der Basalganglien (Calon et al., 1995; Calon et al., 1999; Cenci et al., 1998; Engber et al., 1991) mit dem Auftreten der motorischen Störungen in Verbindung gebracht werden können. Ein entscheidender Faktor bei der Induktion von DIDs scheint die Pharmakokinetik und -dynamik der DA-Rezeptorstimulation zu sein. Pulsatile Stimulation, wie sie der Pharmakodynamik der L-DOPA Stimulation entspricht, induzierte im Tiermodell eher Dyskinesien, als eine kontinuierliche Stimulation, mit langwirksamen DA-Agonisten oder einer kontinuierlicher Applikation von L-DOPA (Calon et al., 1995; Morissette et al., 1996). Ebenso war eine kontinuierliche Gabe von L-DOPA wirksam, die 6-OHDA-induzierten Veränderungen im Glukoseverbrauch sowie der Neuropeptidlevel in den Basalganglien zu normalisieren (Engber et al., 1990; Engber et al., 1991). Ähnliche Befunde zeigen, dass die 6-OHDA- oder MPTP-induzierte anhaltende Induktion von iTFs im Striatum (insbesondere FosB, Δ FosB) nach chronischer pulsatile Gabe von L-DOPA mit der Ausbildung von AIMs bei der Ratte (Andersson et al., 1999) und Dyskinesien beim Affen (Doucet et al., 1996) korreliert, und dass eine kontinuierliche DA-Rezeptorstimulation mit dem langwirksamen Agonisten Cabergolin zu einer Reduktion der MPTP-induzierten Δ FosB Expression führte, ohne dass Dykinesien beobachtet wurden (Doucet et al., 1996). Die Entwicklung der DIDs erfordert sowohl bei Parkinson Patienten, als auch im Versuchstier einen ‚priming‘ Prozess durch eine oder mehrere pulsatile DA-Rezeptorstimulation mit L-DOPA oder kurzwirksame DA-Agonisten (Pinna et al., 1997; Pollack et al., 1997). Sobald die Dyskinesien voll entwickelt sind, zeigt sich eine verstärkte Verhaltensantwort bei erneuter Substanzgabe, selbst nach einem längeren behandlungsfreien Zeiteraum. Dieses Phänomen, ursprünglich beschrieben als Verhaltenssensitivierung in Folge wiederholter Exposition mit Psychostimulantien (Zusammenfassungen in Kalivas, 1995; Kalivas und Stewart, 1991) zeigt die Charakteristik von Lernprozessen, ähnlich der ‚long-term potentiation‘ (LTP). Dies wiederum impliziert langfristige molekulare, biochemische und elektrophysiologische Veränderungen in striatalen Neuronen, die wahrscheinlich an den Einfluss von GLU über NMDA- oder auch AMPA-Rezeptoren (Marin et al., 2000) gebunden sind (Zusammenfassungen in Calabresi et al., 2000a; Calon et al., 2000a). Im weiteren Sinne sprechen alle diese Befunde dafür, dass eine Wiederherstellung des physiologischen DA-Tonus durch kontinuierliche DA-Substitution bereits früh im Krankheitsverlauf sowohl ‚prophylaktische als auch palliative Verbesserungen für Parkinson Patienten‘ verspricht (Chase, 1998).

Unter der Annahme, dass eine kontinuierliche DA-Substitution, im Gegensatz zu einer diskontinuierlichen DA-Rezeptorstimulation, nach DAerger Denervation den Verlust der physiologischen DAergen Kontrolle über die GLU-getriebene Aktivität striataler Projektionsneurone kompensieren kann, und somit im Verlauf der chronischen Behandlung die Ausprägung einer verstärkten Verhaltensantwort (Sensitivierung) und zugrundeliegende zelluläre Veränderungen inhibiert werden, sollen folgende Fragestellungen im Verhaltensexperiment sowie in *post mortem* Analysen bearbeitet werden:

1. Welche Effekte hat die chronische Behandlung mit dem langwirksamen DA-Rezeptor-Agonisten Cabergolin (Plasmaelimination $T_{1/2}$: 65-100 h) (Benedetti et al., 1990) auf die Verhaltensdefizite, ausgelöst durch eine partielle bilaterale striatonigrale 6-OHDA-Läsion, im Vergleich zu Lisurid, einem DA-Agonisten mit kurzer Plasmahalbwertszeit ($T_{1/2}$: 3 h)

- (Hümpel et al., 1981)? Induziert die pulsatile DA-Stimulation über 4 Wochen im DA-denervierten Tier ein Sensitivierung der motorischen Verhaltensantwort, und wird diese durch die kontinuierliche DA-Rezeptorstimulation unterbunden.
2. Einige tierexperimentelle Untersuchungen am MPTP-behandelten Affen und an unilateral 6-OHDA lädierten Ratten haben gezeigt, dass die LIDs bzw. AIMs auffallend assoziiert war mit einer Zunahme bzw. anhaltenden Expression von FRAs, insbesondere FosB und Δ FosB im dorsalen und ventralen Striatum (Andersson et al., 1999; Doucet et al., 1996). Diese chronisch veränderte Genexpression wird auf eine überaktive GLUerge Transmission infolge der DA-Denervation zurückgeführt, die zusätzlich durch die unphysiologische pulsatile DA-Rezeptorstimulation mit L-DOPA verstärkt wird (Calon et al., 2000b). Hieraus ergibt sich die Frage, ob die chronische Behandlung mit dem kurzwirksamen DA-Agonisten Lisurid eine anhaltende iTF Aktivierung (c-Fos, c-Jun) induziert bzw. die 6-OHDA-induzierte iTF Expression verstärkt, und ob dies durch die kontinuierliche DA-Stimulation mit Cabergolin normalisiert wird.
 3. Welche biochemischen und neurochemischen Veränderungen induziert die chronische Behandlung mit Cabergolin und Lisurid im Vorderhirn, gemessen an der Anzahl und den Bindungseigenschaften striataler DA-Rezeptoren, sowie dem Gehalt an biogenen Aminen und deren Metaboliten?
 4. Die Behandlung mit DA-Rezeptor-Agonisten gewinnt zunehmend an Interesse im Hinblick auf neuroprotektive Effekte (Olanow et al., 1998). Es ist Bestandteil der aktuellen Debatte zur Pathogenese der Parkinson-Krankheit, ob die Synthese, der Metabolismus und die Freisetzung von DA über die Bildung von ROS einen wichtigen Faktor bei der Entstehung von oxidativem Stress darstellt. Somatodendritische DA D₂-Autorezeptoren auf SNC Neuronen (Filloux et al., 1988) regulieren die DA-Freisetzung hauptsächlich im somatodendritischen Bereich, jedoch weniger in den Axonterminalen (Cragg und Greenfield, 1997), so dass eine kontinuierliche Stimulation dieser Autorezeptoren die DA-Freisetzung und auch Synthese von DA über die Inhibition der TH (O'Hara et al., 1996) langfristig vermindert. Dies könnte in bereits gestressten DAergen Neuronen protektive Effekte haben, und möglicherweise ihr Überleben sichern. Weiterhin wird eine Behandlung mit DA-Agonisten zu einer Wiederherstellung des DAergen Tonus führen (Olanow und Tatton, 1999) und entsprechend der GLUergen Überfunktion des STN und des PPTg (siehe 4.5.) entgegenwirken, womit die postulierte STN-/PPTg-vermittelte Exzitotoxizität zumindest vermindert würde. Histologische Untersuchungen der mesencephalen Neurone in der SNC und im VTA sollen eine Aussage über diese möglichen neuroprotektiven Effekte der frühen Behandlung (Beginn: 8 Tage nach Läsion) mit DA-Agonisten ermöglichen. Im gleichen Zusammenhang soll die Untersuchung der CB-positiven Neuronenpopulationen mögliche kompensatorische Mechanismen erkennen lassen.
 5. Es wurde gezeigt, dass eine partielle mesostriatale DAerge Degeneration langanhaltend Veränderungen neuronaler Aktivitäten in verschiedenen Strukturen der Basalganglien und des limbischen Systems induzieren kann (siehe 4.5.) womit die postulierten Transmitterimbalancen teilweise unterstützt werden. Hier soll nun untersucht werden, ob eine frühe und dauerhafte DA-Substitution den DAergen Tonus auch in ‚extranigralen‘

Bereichen wiederherstellen kann und dies Effekte auf die 6-OHDA-induzierten veränderten Expressionmuster von c-Fos und c-Jun hat.

5.2. Versuchsdurchführung

Für den Versuch zur Wirkung einer Langzeitbehandlung mit DA D2-Rezeptor-Agonisten auf die neurodegenerativen Effekte der intrastriatalen 6-OHDA Läsion wurden 56 adulte, männliche Sprague-Dawley Ratten operiert. Nach angegebenem Operationsverfahren (siehe 3.2) wurden pro Striatum 20 µg/2µl 6-OHDA (N=46), verteilt auf zwei Injektionsorte an folgenden Injektionskoordinaten infundiert: AP: 0.5/-0.4 mm, lateral: ±2.8/±3.4 mm, dorsoventral: -5.0/-4.8 mm. Kontrolltieren (N=10) wurde das entsprechende Volumen (2 x 1 µl/Striatum) 0.1 % Ascorbat, 0.9% NaCl infundiert. Am Tag 9 nach der Läsion wurde mit der täglichen Behandlung mit Saline (Kontrolle-SAL: N=10; OHDA-SAL: N=13, 1 ml/kg, s.c., 1x täglich 09⁰⁰), Cabergolin (OHDA-CAB: N=15, 0.25 mg/kg s.c., 1x täglich, 09⁰⁰) bzw. Lisurid (OHDA-LIS: N=11, 0.25 mg/kg s.c., 2x täglich, 09⁰⁰ und 16⁰⁰) über einen Zeitraum von 28 Tagen, begonnen. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Läsion auf spontane (Läsions-bedingte), Apomorphin-induzierte (0.5 mg/kg s.c.), sowie substanz-induzierte (30 min nach Applikation) Verhaltensveränderungen getestet (siehe 3.5.). Die Gehirne wurden 38 Tage nach der Läsion für neurochemische (siehe 3.6.1), biochemische (siehe 3.7.1.) und histologische (siehe 3.8.1.) Untersuchungen entnommen und präpariert. Der Zeitplan für die Versuchsdurchführung ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Zeitplan der Versuchsdurchführung

Tag	Behandlung/Versuch
0	Operation
8	Spontanverhalten: Katalepsie, Lokomotion, Exploration, Schnüffeln Apomorphin-induziertes Verhalten: Lokomotion, Exploration, Schnüffeln
9	Beginn der Behandlung mit DA-Agonisten Substanz-induziertes Verhalten: Lokomotion, Exploration, Schnüffeln
36	Ende der Behandlung mit DA-Agonisten Substanz-induziertes Verhalten: Lokomotion, Exploration, Schnüffeln
37	Spontanverhalten: Katalepsie, Lokomotion, Exploration, Schnüffeln Apomorphin-induziertes Verhalten: Lokomotion, Exploration, Schnüffeln
38	Dekapitierung, Perfusion

5.3 Ergebnisse

Von 46 Tieren die eine bilaterale 6-OHDA-Läsion erhalten hatten, verstarb ein Saline-behandeltes Tier (entspricht 7% Läsions-bedingte Ausfallrate) und 3 Lisurid-behandelte Tier (entspricht 21 % substanzbedingter Ausfallrate). Die Überwachung der Körpergewichte ergab Unterschiede in der Gewichtszunahme (Abb. 24) zwischen den Behandlungsgruppen über den Beobachtungszeitraum [2-ANOVA für Faktor ZEIT: $F_{5,225}=17.5$, $p<0.0001$], mit bedeutenden Substanzeffekten [2-ANOVA für Interaktion: $F_{15,293}=2.02$, $p=0.01$]. Die Behandlung mit Lisurid löste akut, 20 min nach Injektion, eine gesteigerte Lokomotion im Haltungskäfig aus, die von starkem Speichelfluss, interindividueller Aggression und homosexuellen Verhalten begleitet wurde, sich jedoch innerhalb von 2-3 h nach Applikation

normalisierte. Derartige Verhaltensveränderungen wurden nicht beobachtet nach der Injektion von Cabergolin.

5.3.1. Spontanverhalten

Katalepsietest

Die intrastriatale 6-OHDA-Läsion führte zu einer Zunahme der Abstiegslatenzen, die über den Behandlungszeitraum erhalten blieb (Abb. 25). Die chronische Behandlung mit Lisurid führte zu einer Zunahme der Katalepsie im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen [Kruskal-Wallis ANOVA: Gitter: $\chi^2=18.03$, $p=0.0004$; Stange: $\chi^2=21.13$, $p<0.0001$] und im Vergleich zum Prätest am Tag 8 [Friedman ANOVA: Gitter: $\chi^2=11.0$, $p=0.0009$; Stange: $\chi^2=4.5$, $p=0.03$]. Wiederholtes Testen führte bei den Saline behandelten Kontrolltieren zu einer signifikanten Zunahme der Abstiegslatenzen [Friedman ANOVA: Gitter: $\chi^2=9.0$, $p=0.003$; Stange: $\chi^2=8.1$, $p=0.004$].

„open field“ mit „hole board“

Bezüglich der untersuchten Verhaltensparameter induzierte die intrastriatale 6-OHDA-Läsion eine signifikante Abnahme der lokomotorischen und explorativen Aktivität (Abb. 26), ohne Effekte der DA-Agonisten Behandlung. Die Immobilität nahm 8 Tage nach Läsion zu [Kruskal-Wallis ANOVA: $\chi^2=13.4$, $p=0.004$], und verstärkte sich bei den OHDA-SAL Tieren innerhalb von 4 Wochen weiterhin [Friedman-ANOVA: $\chi^2=8.3$, $p=0.004$]. Die Vorwärtslokomotion (Felderwechsel) war ZEIT-abhängig signifikant reduziert [$F_{1,28}=53.4$, $p<0.0001$] mit einer signifikanten Interaktion zwischen BEHANDLUNG und ZEIT [$F_{3,115}=3.4$, $p=0.01$]. Die Analyse der vertikalen Exploration ergab eine ZEIT-abhängige [$F_{1,28}=23.2$, $p<0.0001$] Abnahme des Aufrichtens, mit einer signifikanten Interaktion [$F_{3,115}=3.6$, $p=0.02$]. Weiterhin war die Anzahl der ‚head dips‘ LÄSIONS-bedingt reduziert [$F_{3,87}=8.8$, $p<0.0001$], mit einer signifikanten ZEIT-BEHANDLUNGS Interaktion [$F_{3,115}=8.1$, $p<0.0001$].

Experimentierkammer

Die in der Experimentierkammer ermittelten Verhaltensparameter (Abb. 27) zeigen eine 6-OHDA-induzierte Zunahme der Immobilität [Kruskal-Wallis ANOVA; $\chi^2=44.1$, $p<0.0001$], die bei wiederholtem Testen in der Kontrolle-SAL und Cabergolin behandelten Gruppe zunahm [Friedman-ANOVA: Kontroll-SAL: $\chi^2=10$, $p=0.002$, OHDA-CAB: $\chi^2=8.1$, $p=0.005$]. *Post-hoc* Tests ergaben eine signifikante Abnahme des spontanen Schnüffeln in der Kontrolle-SAL Gruppe [2-ANOVA für Interaktion: $F_{3,111}=7.25$, $p=0.0002$] und eine ZEIT-abhängige Abnahme der Drehungen in der Kontrolle-SAL, OHDA-LIS und OHDA-CAB Gruppe [2-ANOVA: $F_{1,27}=81.6$, $p<0.0001$].

5.3.2. Substanz-induziertes Verhalten

„open field“ mit „hole board“

Die akute Behandlungen mit Lisurid reduzierten die vertikale Exploration [$F_{3,90}=44.8$, $p<0.0001$] und die Zahl der ‚head dips‘ [$F_{3,90}=13.3$, $p<0.0001$] signifikant (Abb. 28C,D). Zusätzlich induzierte die chronische Lisuridbehandlung eine signifikante Zunahme der Vorwärtslokomotion [2-ANOVA für Interaktion: $F_{3,119}=22.4$, $p<0.0001$] (Abb. 28B). Die erste Lisuridgabe löste eine Zunahme der Immobilität aus [Kruskal-Wallis ANOVA: $\chi^2=20.4$, $p=0.005$] (Abb. 28A), gekennzeichnet durch ausgeprägtes stereotypes Schüffeln (s.u.), die

jedoch nach chronischer Substanzgabe aufgehoben wurde [Friedman-ANOVA: $\chi^2=2.4$, $p=0.007$], zugunsten der Lokomotion (Abb. 28B).

Experimentierkammer

Die akute Lisuridapplikation (Abb. 29) löste sowohl bei der ersten Gabe als auch nach chronischer Behandlung stereotypes Schnüffeln in der Experimentierkammer aus [2-ANOVA für Interaktion: $F_{3,119}=5.13$, $p=0.003$]. Weiterhin zeigten die chronisch Lisurid-behandelten Tiere stereotypes Drehen um die eigene Körperachse [2-ANOVA für Interaktion: $F_{3,119}=3.4$, $p=0.02$].

5.3.3. Apomorphin-induziertes Verhalten

„open field“ mit „hole board“

Die Injektion von 0.5 mg/kg Apomorphin am Tag 8 Tage nach 6-OHDA-Läsion reduzierte signifikant die Vorwärtslokomotion (Abb. 30B), parallel dazu war die Immobilität, gekennzeichnet durch stereotypes Schnüffeln auf der Stelle, bei diesen Tieren erhöht [Kruskal-Wallis ANOVA: $\chi^2=14.4$, $p=0.04$]. Weiterhin ergab die 2-ANOVA eine signifikante Interaktion zwischen BEHANDLUNG und ZEIT für den Parameter Felderwechsel [$F_{3,119}=4.4$, $p=0.007$].

Experimentierkammer

Apomorphin löste stereotypes Schnüffeln in der Experimentierkammer aus [2-ANOVA für BEHANDLUNG: $F_{3,84}=2.8$, $p=0.04$], das 8 Tage nach 6-OHDA-Läsion verstärkt war gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 31A). Die chronische Behandlung mit den DA-Agonisten hatte darauf keinen weiteren Effekt, genausowenig konnte Apomorphin ein BEHANDLUNGS-bedingtes, verstärktes Drehverhalten auslösen.

5.3.4. Dopamin Rezeptor Bindungen

Das Rezeptorsättigungs-Bindungsassay für [^3H]SCH23390 und [^3H]Racloprid in den striatalen Gewebeshomogenaten ergab eine Zunahme der DA D1- [127.0 ± 6.0 %; $F_{3,32}=4.9$, $p=0.007$] und DA D2- [155.3 ± 30.5 %; $F_{3,32}=3.51$, $p=0.03$] Rezeptordichten nach chronischer Behandlung mit Cabergolin im Vergleich zur Kontrolle-SAL Gruppe (siehe Tabelle 9).

5.3.5. Neurochemie

Die Wirkungen der chronische Behandlung mit Lisurid und Cabergolin auf den Gewebegehalt der biogenen Amine DA, NA und 5-HT sowie deren Metaboliten DOPAC, HVA und 5-HIAA im rostralen und kaudalen CPu, Acb und mPFC nach intrastriataler 6-OHDA-Läsion sind in (Abb. 32) dargestellt. Die 6-OHDA-Läsion verursachte im CPu Entleerungen von DA auf 47 – 59 % der Kontrolle [$F_{3,32}=20.3$, $p<0.0001$] bzw. von NA auf 28 – 42 % der Kontrolle [$F_{3,32}=3.7$, $p=0.02$], sowie eine Reduktion von HVA auf 55 – 82 % der Kontrolle [$F_{3,32}=3.65$, $p=0.02$]. Dies blieb von der Agonistenbehandlung unbeeinflusst (Abb. 32A). Im Acb war der Gehalt aller Neurotransmitter und Metaboliten signifikant bzw. mit statistischem Trend erhöht [NA: $F_{3,32}=2.5$, $p=0.08$ DOPAC: $F_{3,32}=8.2$, $p=0.0004$; DA: $F_{3,32}=12.7$, $p<0.0001$; HIAA: $F_{3,32}=4.9$, $p=0.0074$; HVA: $F_{3,32}=5.9$, $p=0.003$; 5-HT: $F_{3,32}=9.1$, $p=0.0002$] (Abb. 32C,D). Der *post-hoc* Vergleich ergab eine signifikante Erhöhung von DOPAC, DA, HVA und 5-HT nach der Behandlung mit Cabergolin gegenüber der Kontrollgruppe bzw. der 6-OHDA-Läsion. Die 6-OHDA-Läsion selbst erhöhte den Gewebsgehalt von 5-HT im Acb. Im

CPu rief die 6-OHDA-Läsion eine Zunahme des DA-Metabolismus aus [DOPAC/DA: $F_{3,32}=3.2$, $p=0.04$] (Abb. 32B). Im Gegensatz dazu waren sowohl der DA- als auch der 5-HT-Metabolismus im Acb erniedrigt [DOPAC/DA: $F_{3,32}=3.1$, $p=0.04$, HVA/DA: $F_{3,32}=5.0$, $p=0.006$; 5-HIAA/5-HT: $F_{3,32}=2.8$, $p=0.05$] wobei die chronische Behandlung mit Lisurid das HVA/DA Verhältnis im Acb signifikant reduzierte. Im mPFC hatte die chronische Behandlung mit Cabergolin reduzierende Effekte auf den Gehalt von DA und seinen Metaboliten [DOPAC: $F_{3,32}=3.2$, $p=0.04$, DA: $F_{3,32}=3.2$, $p=0.04$; HVA: $F_{3,32}=3.2$, $p=0.04$], der angewandte paarweise *post-hoc* Vergleich ergab jedoch keine signifikanten Effekte gegenüber den anderen Behandlungsgruppen (Abb. 32E,F).

5.3.6. Histologie

Veränderungen ventraler Mittelhirnneurone

Die intrastriatale 6-OHDA Infusion induzierte eine nach 38 Tagen signifikante retrograde Degeneration in der SNC (59.2 ± 3.5 % der Kontrolle) und im VTA (78.1 ± 4 % der Kontrolle), gemessen an der numerischen Dichte der Nissl-gefärbten Neurone [Kruskal-Wallis ANOVA: SNC: $\chi^2=17.2$, $p=0.0006$, $\chi^2=7.8$, $p=0.05$] (Abb. 33). In beiden Mittelhirnstrukturen ergab der paarweise *post-hoc* Vergleich eine signifikante Zunahme der Nissl-gefärbten Neurone als Folge der chronischen Behandlung mit Lisurid und Cabergolin gegenüber der 6-OHDA-Läsion, das Kontrollniveau wurde jedoch nur im VTA erreicht. Die Anzahl der TH-positiven Neurone in der SNC war sowohl nach 6-OHDA-Läsion als auch nach DA-Agonistenbehandlung reduziert ($37-46.5$ % der Kontrolle) [Kruskal Wallis ANOVA: $\chi^2=6.42$, $p=0.09$], im VTA wurde kein signifikanter Verlust TH-positiver Neurone beobachtet (Abb. 33B). Aus experimentellen Gründen wurde die Nissl- und TH-Färbung an immersionsfixiertem Gewebe durchgeführt, dadurch liess die Qualität der Färbungen keine stereologie-basierte Auswertung der absoluten Neuronenzahlen zu, sondern eine Abschätzung der numerischen Dichten (Neurone/mm³). Die Darstellungen der relativen Veränderungen nach Behandlung im Vergleich zur Kontrolle erschien hier zulässig, da die Infusion von 0.1 % Ascorbat keine retrograde Degeneration auslöst (Ichitani et al., 1994) und daher als intaktes Mittelhirn betrachtet werden kann.

Die Bewertung der morphologischen Veränderungen der SNC nach Nissl-Färbung (Abb. 36) verdeutlichen die Abnahme der Zelldichte nach 6-OHDA-Läsion, begleitet von einer Gliose. Die verbleibenden Neurone in der SNC zeigen zelluläre Atrophie, Reduktion der zytoplasmatischen Nisslsubstanz sowie einen Verlust der nukleären Kompartimentierung (Abb. 36B), als Anzeichen voranschreitender pathomorphologischer Veränderungen. Die Behandlung mit Cabergolin scheint dagegen, zumindest teilweise eine qualitative Verbesserung dieser Veränderungen zu bewirken (Abb. 36D), auch wenn der Verlust der TH-positiven Neurone deutlich bleibt (Abb. 37).

Die stereologie-basierte Abschätzung der absoluten Anzahl Calbindin-positiver Neurone ergab keine 6-OHDA-bedingten oder DA-Agonisten-induzierten Veränderungen (ohne Abbildung).

Quantitative Veränderungen der c-Fos Expression

Die quantitative Abschätzung der numerischen Dichte c-Fos-positiver Neurone in verschiedenen Gehirnregion nach 6-OHDA-Läsion konnte wesentliche Effekte der

chronischen Behandlung mit Cabergolin auf die Expression von c-Fos zeigen (Abb. 34). Sowohl im CPu als auch im Acb reduzierte Cabergolin die 6-OHDA-bedingte c-Fos Expression (Abb. 38A,B) [Kruskal-Wallis ANOVA: rCPu: $\chi^2=6.9$, $p=0.08$; cCPu: $\chi^2=6.6$, $p=0.09$; Acbc: $\chi^2=8.1$, $p=0.04$; Acbsh: $\chi^2=5.1$, $p=0.12$; mit signifikanten Mann-Whitney *U*-Test] (Abb. 34 A,B). Entsprechende Effekte der Cabergolinbehandlung waren in weiteren Kernen der dorsalen Basalganglien Schleife (Abb. 34C) [Kruskal-Wallis ANOVA: LGP: $\chi^2=5.8$, $p=0.12$; MGP: $\chi^2=6.2$, $p=0.1$; mit signifikanten Mann-Whitney *U*-Test] sowie Kernen des EA Komplex (Abb. 38C-F) [BSTL: $\chi^2=7.1$, $p=0.07$; Me: $\chi^2=10.4$, $p=0.02$; mit signifikanten Mann-Whitney *U*-Test] (Abb. 34E) zu beobachten. Die chronische Behandlung mit Lisurid konnte im mPFC [$\chi^2=4.2$, $p=0.2$ mit signifikanten Mann-Whitney *U*-Test] sowie im Me die 6-OHDA-bedingte c-Fos Expression reduzieren.

Quantitative Veränderungen der c-Jun Expression

Die chronische Behandlung mit Cabergolin und Lisurid hatte wesentliche Effekte auf die Expression von c-Jun verglichen mit der 6-OHDA-Läsione (Abb. 35). In den Kernen der dorsalen und ventralen Basalganglien Schleifen reduzierte Cabergolin die Expression von c-Jun [Kruskal-Wallis ANOVA: LGP: $\chi^2=10.0$, $p=0.02$; mPFC: $\chi^2=4.3$, $p=0.2$; VTA: $\chi^2=6.7$, $p=0.08$; PPTg: $\chi^2=8.4$, $p=0.04$ mit signifikanten Mann-Whitney *U*-Test] (Abb. 35C,D). Weitere Effekte hatte die Cabergolinbehandlung im STN [$\chi^2=4.3$, $p=0.2$ mit signifikanten Mann-Whitney *U*-Test], in der SNR [$\chi^2=4.3$, $p=0.2$ mit signifikanten Mann-Whitney *U*-Test] und im BSTL [$\chi^2=9.4$, $p=0.02$] auf die normale bzw. Lisurid-assoziierte Expression von c-Jun.

Qualitative Veränderungen der c-Fos und c-Jun Expression

Der qualitative Vergleich der Expressionsmuster von c-Fos und c-Jun zeigte eine langanhaltende, mitunter schichtspezifische Zunahme in allo- und isokortikalen Regionen, sowie in ausgewählten Kernen des Thalamus und des limbischen Vorderhirns (siehe Tabelle 10). Diese waren hauptsächlich mit der 6-OHDA-Läsion assoziiert, und wurde durch die chronische Behandlung mit den DA-Agonisten selektiv beeinflusst. Auf die anhaltende, vermehrte Expression von c-Fos im lateralen Hypothalamus bzw. von c-Jun im centromedialen Thalamus und der CA3-Region des Hippokampus nach 6-OHDA-Läsion, hatte keiner der DA-Agonisten einen reduzierenden Effekt.

Qualitativer Nachweis von DNA-Fragmentation

Mit der TUNEL-Methode konnten bis auf die als interne Kontrolle dienenden TUNEL-positiven Zellkerne in den Ependymzellen der Meningen und des zerebralen Ventriklesystems, keine DNA-Fragmentation in den Gehirnen aller Behandlungsgruppen nachgewiesen werden. Positiv-Kontrollschnitte zeigten ubiquitäre TUNEL IR, so dass, auch auf grund reaktiver Ependymzellen, ein falsch-negatives Ergebnis ausgeschlossen werden kann.

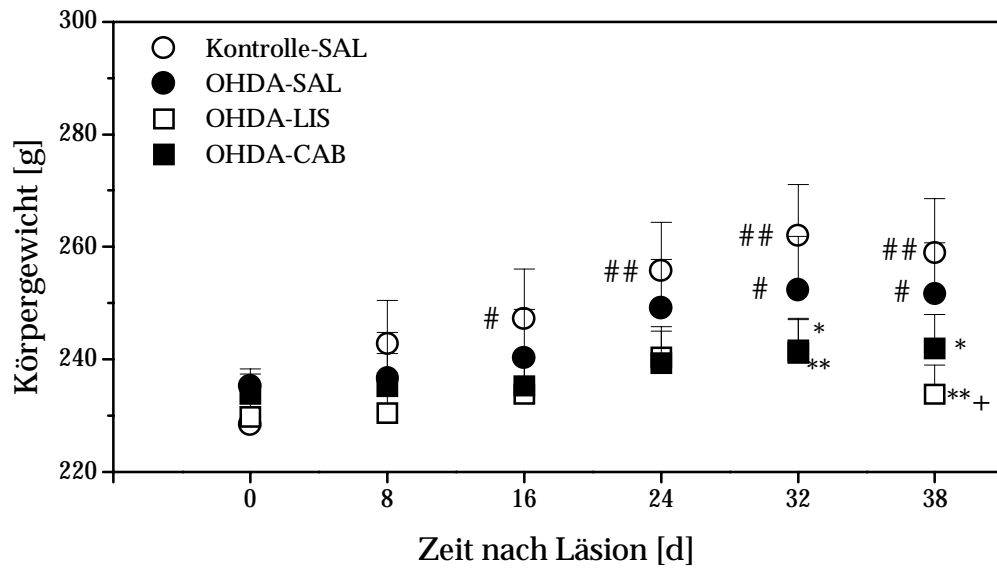


Abb. 24: Wirkung der Behandlung mit Cabergolin (N=15) und Lisurid (N=11) nach intrastriärer 6-OHDA-Läsion (N=13) auf die Gewichtszunahme verglichen mit Saline behandelten Kontrolltieren (N=10). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle-SAL, + $p < 0.05$ vs. OHDA-SAL; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs Tag 0 (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

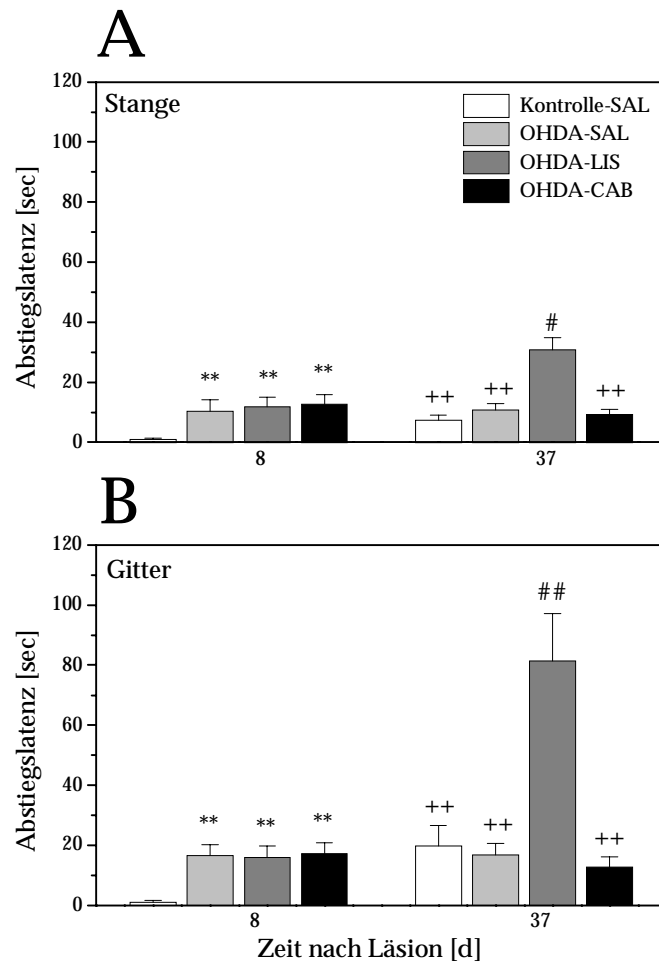


Abb. 25: Wirkung der chronischen Behandlung mit Cabergolin (N=15) und Lisurid (N=11) auf die spontane Kalapesie nach intrastriärer 6-OHDA-Läsionen (N=13) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=10) gemessen an der vertikalen Stange (A) und am horizontalen Gitter (B) 8 und 37 Tage nach Läsion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; ** $p < 0.01$, vs. Kontrolle-SAL, ++ $p < 0.01$ vs. OHDA-LIS (Mann-Whitney *U*-Test für paarweisen Vergleich); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Tag 8 (Wilcoxon-Signed Rang Test für paarweisen Vergleich bei wiederholter Messung).

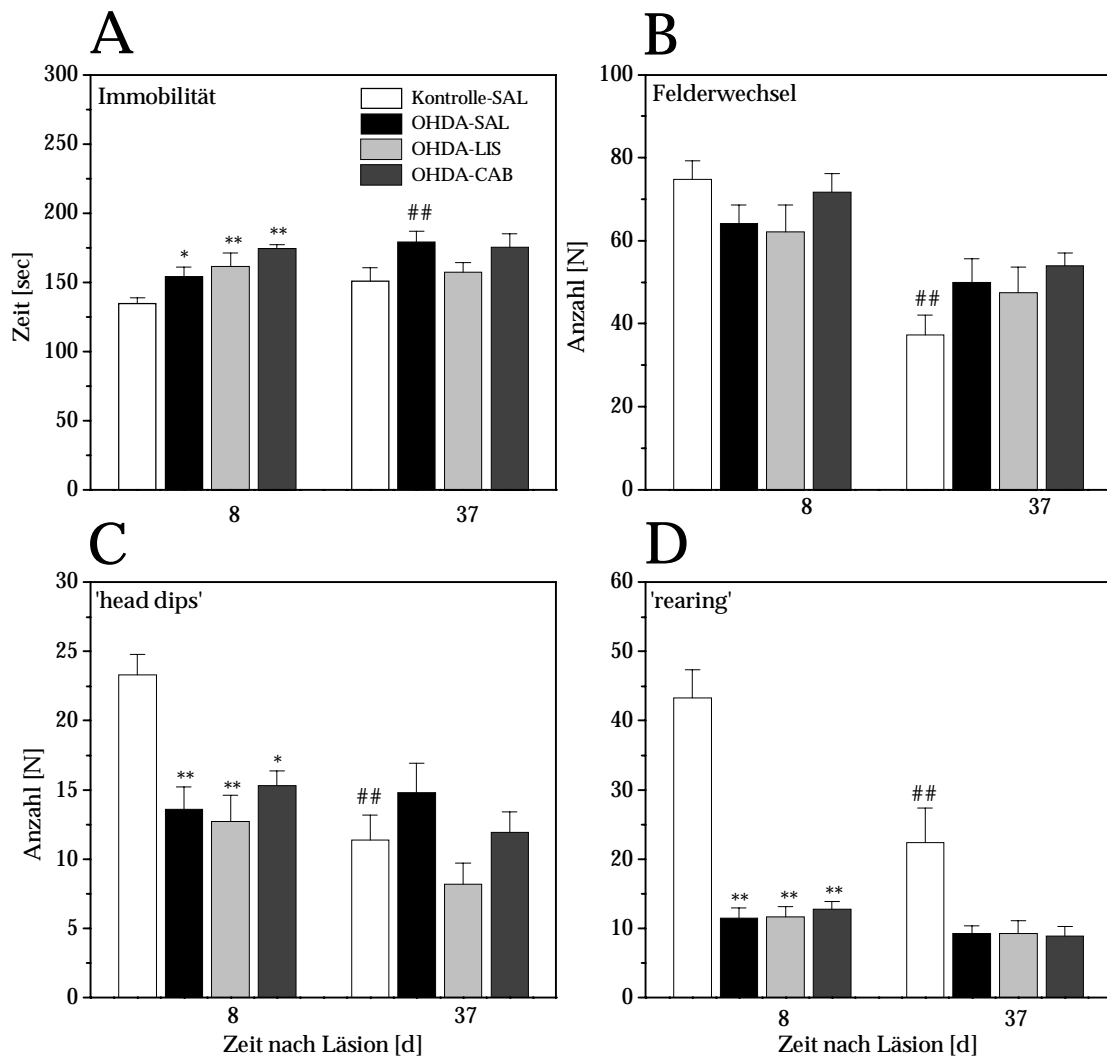


Abb. 26: Wirkung der chronischen Behandlung mit Cabergolin (N=15) und Lisurid (N=11) auf die spontane Lokomotion und Exploration nach intrastriatärer 6-OHDA-Läsionen (N=13) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=10) gemessen im 'open field' [Immobilität (A), Vorwärtslokomotion (B), Anzahl der 'head dips' (C) and 'rearings' (D)] 8 und 37 Tage nach Läsion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; (A): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. Kontrolle (Mann-Whitney *U*-Test), ## $p < 0.01$ vs. Tag 8 (Wilcoxon-Signed Rang Test für paarweisen Vergleich bei wiederholter Messung); (B-D): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle-SAL, ## $p < 0.01$ vs. Tag 8 (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

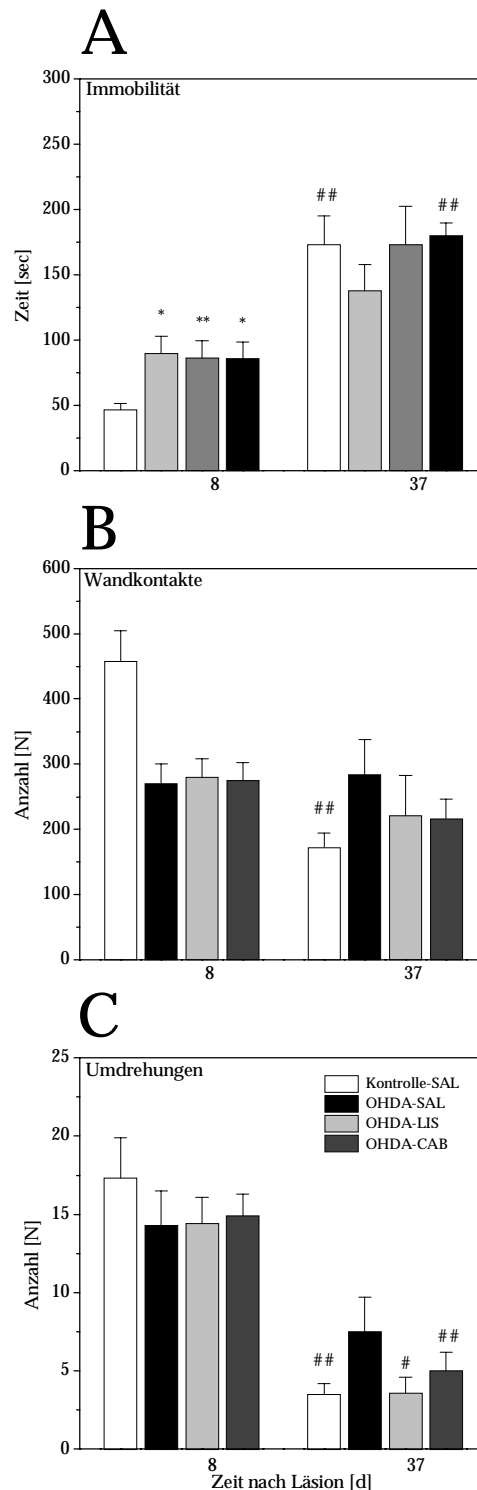


Abb. 27: Wirkung der chronischen Behandlung mit Cabergolin (N=15) und Lisurid (N=11) auf das spontane Schnüffelverhalten nach intrastriatärer 6-OHDA-Läsionen (N=13) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=10) gemessen in der Experimentierkammer [Immobilität (A), Wandkontakte (B), Umdrehungen (C)] 8 und 37 Tage nach Läsion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; (A): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. Kontrolle (Mann-Whitney *U*-Test), ## $p < 0.01$ vs. Tag 8 (Wilcoxon-Signed Rang Test für paarweisen Vergleich bei wiederholter Messung); (B, C): # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Tag 8 (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

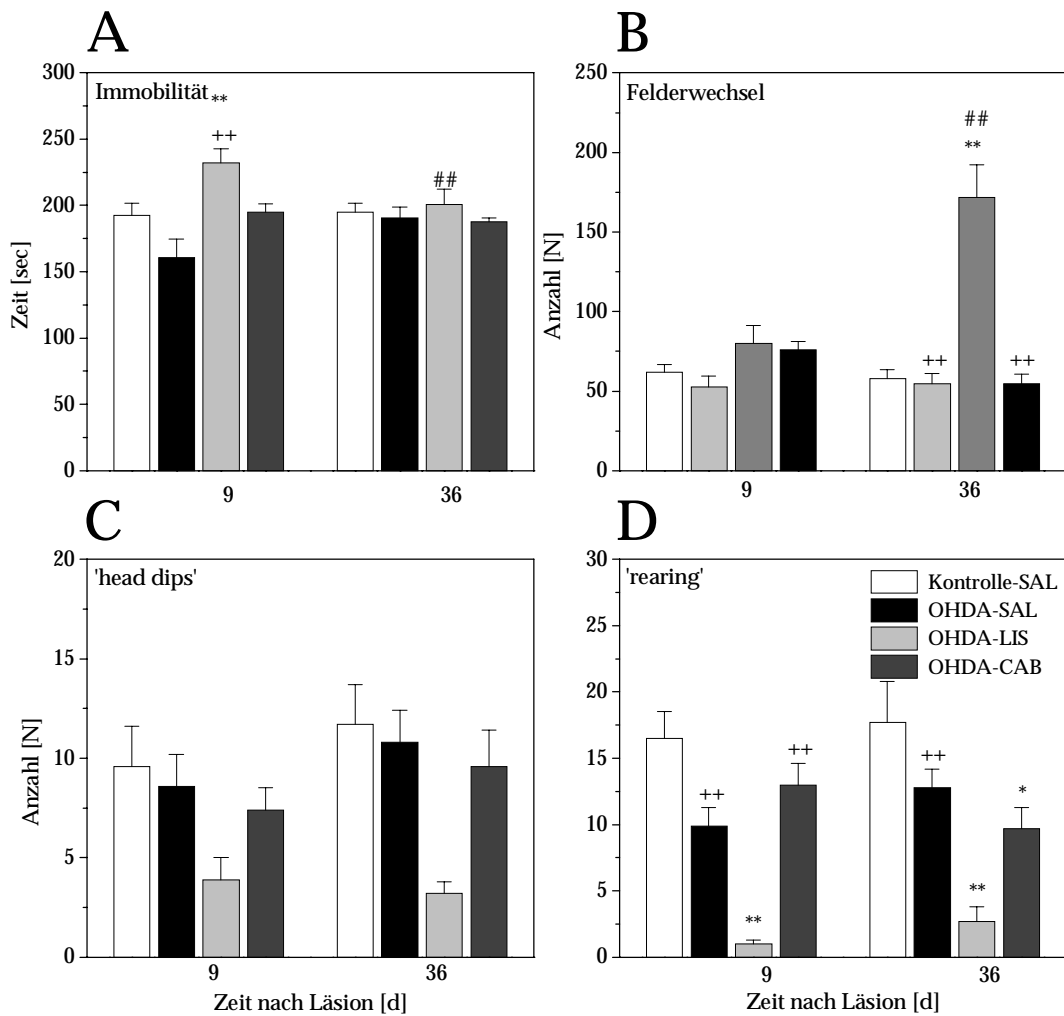


Abb. 28: Akute Wirkung der Behandlung mit 0.25 mg/kg s.c. Cabergolin (N=15) und 0.25 mg/kg s.c. Lisurid (N=11) auf die Lokomotion und Exploration nach intrastriataler 6-OHDA-Läsionen (N=13) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=10) gemessen im 'open field' [Immobilität (A), Vorwärtslokomotion (B), Anzahl der 'head dips' (C) and 'rearings' (D)] 9 und 36 Tage nach Läsion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; (A): ** $p < 0.01$, vs. Kontrolle-SAL, ++ $p < 0.01$ vs. OHDA-SAL und OHDA-CAB (Mann-Whitney *U*-Test), ## $p < 0.01$ vs. Tag 9 (Wilcoxon-Signed Rang Test für paarweisen Vergleich bei wiederholter Messung); (B-D): ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle-SAL, ++ vs. OHDA-LIS, ## $p < 0.01$ vs. Tag 9 (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

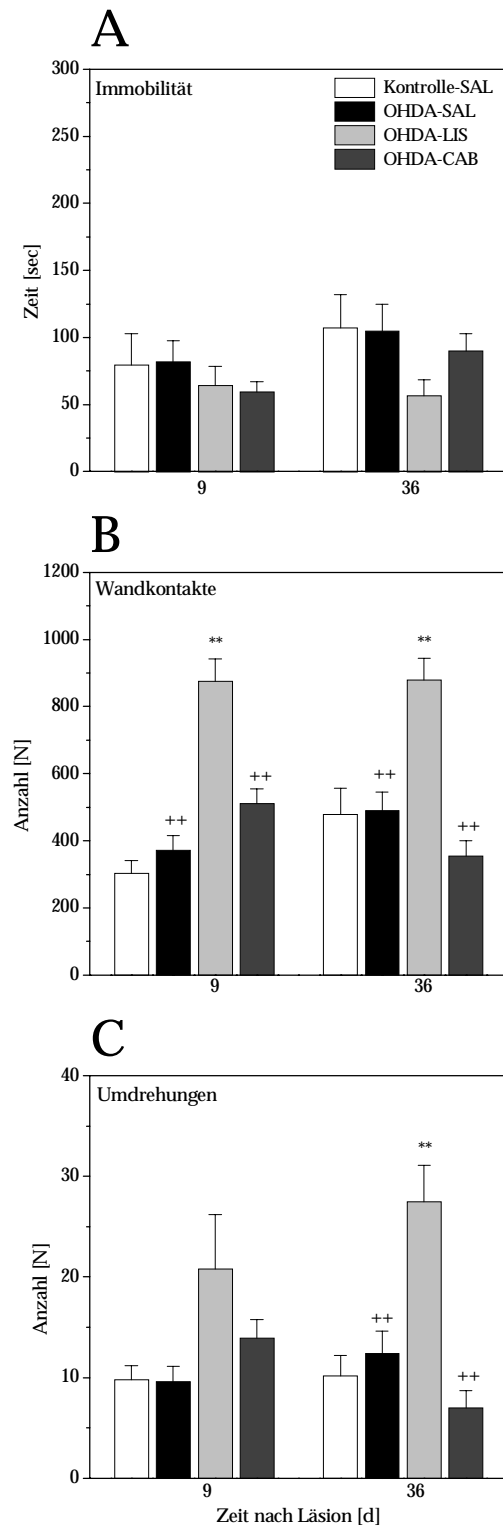


Abb. 29: Akute Wirkung der Behandlung mit 0.25 mg/kg s.c. Cabergolin (N=15) und 0.25 mg/kg s.c. Lisurid (N=11) auf das Schnüffelverhalten nach intrastriateller 6-OHDA-Läsionen (N=13) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=10) gemessen in der Experimentierkammer [Immobilität (A), Wandkontakte (B), Umdrehungen (C)] 9 und 36 Tage nach Läsion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle-SAL, ++ $p < 0.01$ vs. OHDA-LIS (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

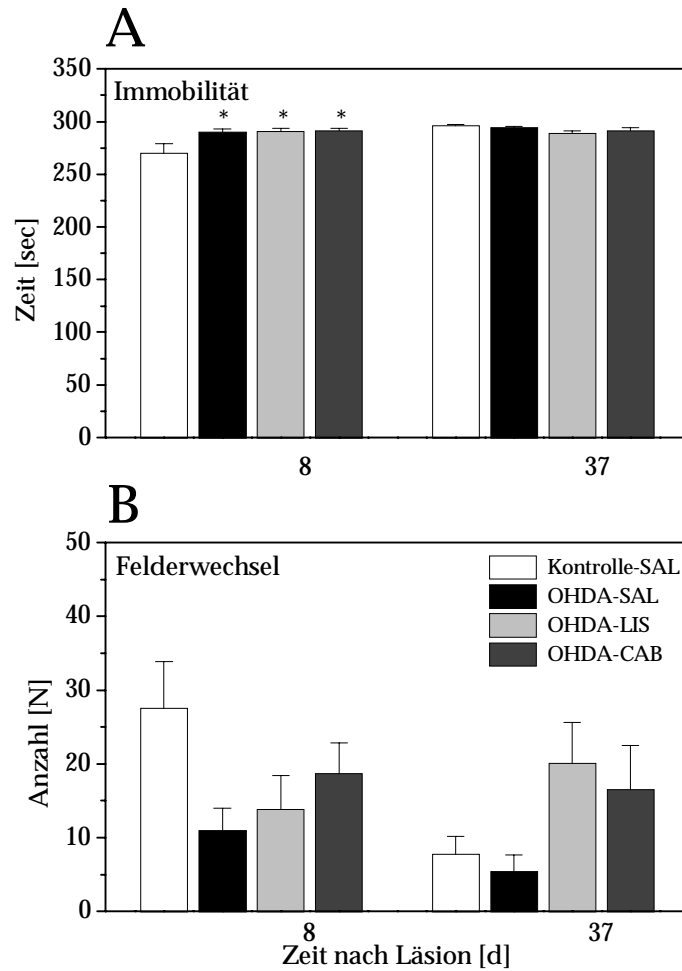


Abb. 30: Wirkung der Behandlung mit Cabergolin (N=15) und Lisurid (N=11) auf die Apomorphin-induzierte (0.5 mg/kg s.c.) Lokomotion nach intrastriärer 6-OHDA-Läsionen (N=13) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=10) gemessen im 'open field' [Immobilität (A), Vorwärtslokomotion (B)] vor (Tag 8) und nach der chronischen Behandlung (Tag 37). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; * $p < 0.05$, vs. Kontrolle-SAL (Mann-Whitney *U*-Test für paarweisen Vergleich).

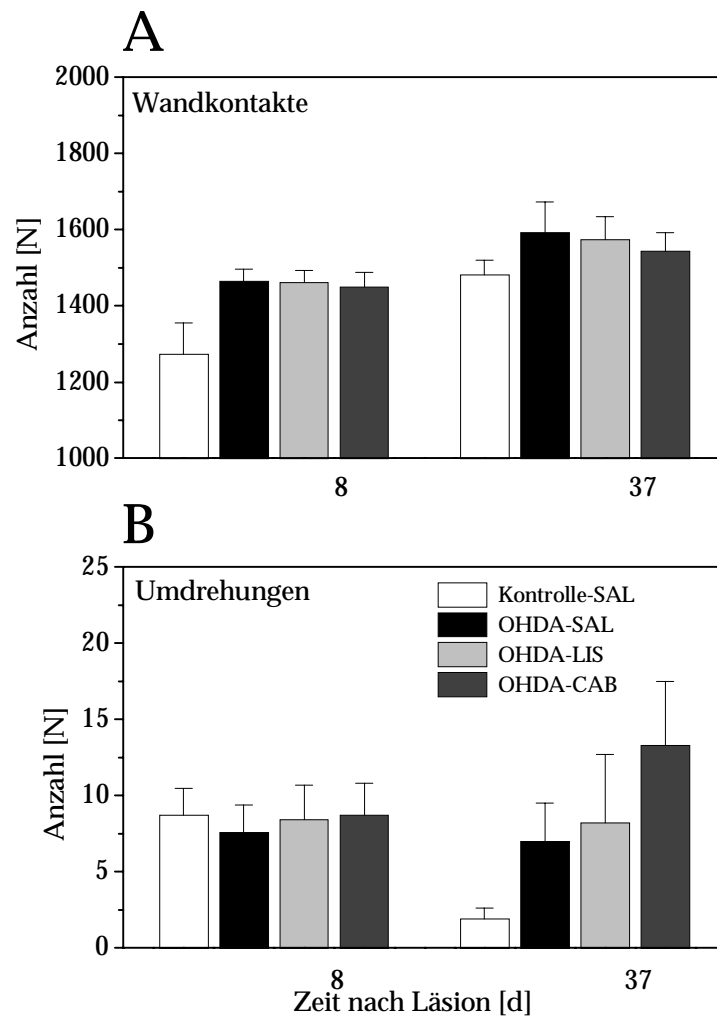


Abb. 31: Wirkung der chronischen Behandlung mit Cabergolin (N=15) und Lisurid (N=11) auf das Apomorphin-induzierte Schnüfferverhalten nach intrastriatärer 6-OHDA-Läsionen (N=13) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=10) gemessen in der Experimentierkammer [Wandkontakte (A), Umdrehungen (B)] vor (Tag 8) und nach der chronischen Behandlung (Tag 37). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M..

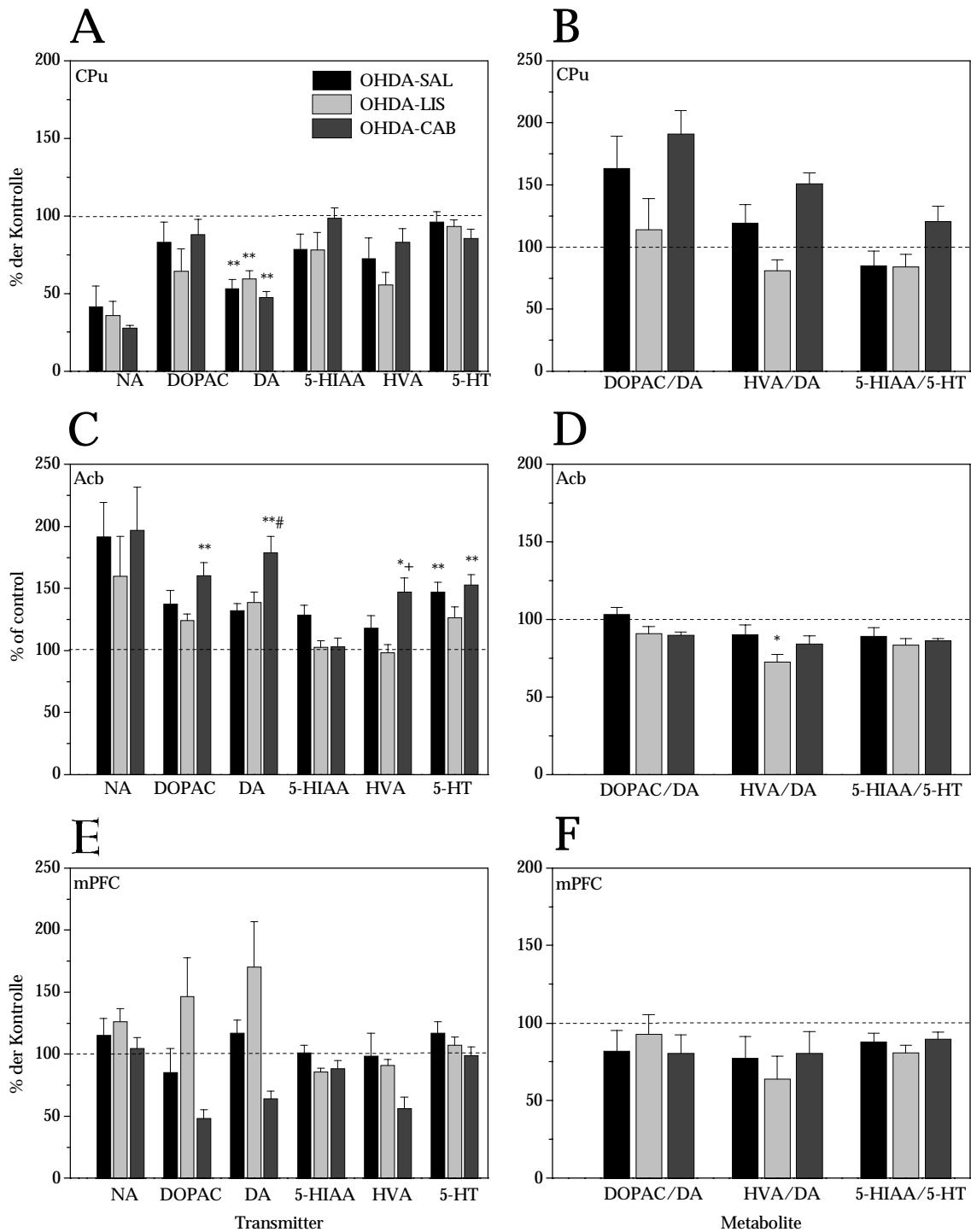


Abb. 32: Wirkung der chronischen Behandlung mit Cabergolin (N=9) und Lisurid (N=8) auf die Gewebegehalte der biogenen Amine NA, DA und 5-HT sowie deren Metaboliten DOPAC, HVA und 5-HIAA im Vorderhirn [CPu (A); Acb (B); mPFC (C)] nach intrastriatärer 6-OHDA-Läsionen (N=8) im relativen (%) Vergleich zu Kontrolltieren (N=8). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. Kontrolle-SAL, # $p < 0.05$ vs. OHDA-SAL; + $p < 0.05$ vs. OHDA-LIS (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

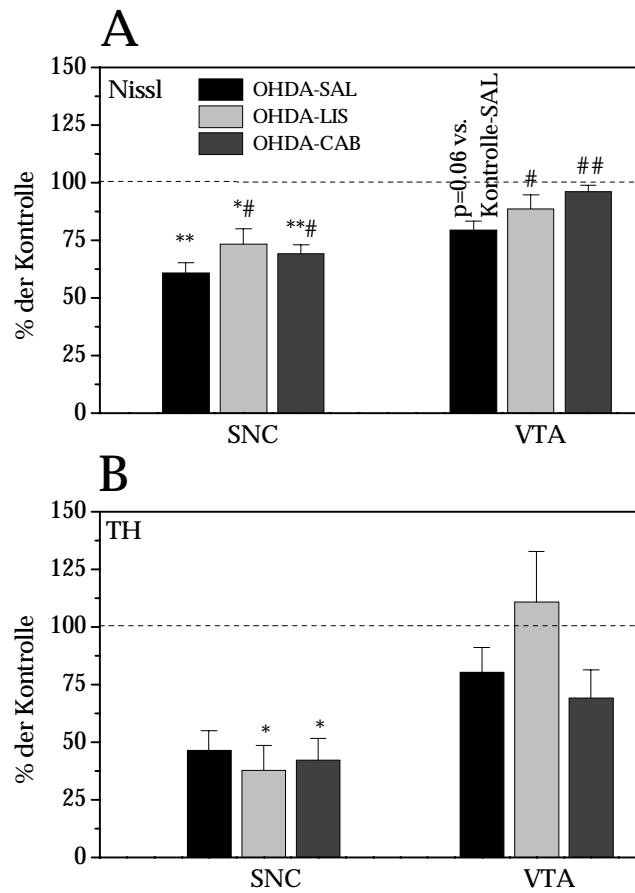


Abb. 33: Wirkung der chronischen Behandlung mit Cabergolin (N=9) und Lisurid (N=8) auf die numerische Dichte [Neurone/mm³] Nissl-gefärbter (A) und TH-positiver (B) Neurone in der SNC und im VTA nach intrastriärer 6-OHDA-Läsionen (N=8) im relativen (%) Vergleich zu Kontrolltieren (N=8). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. Kontrolle-SAL, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. OHDA-SAL (Kruskal-Wallis *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

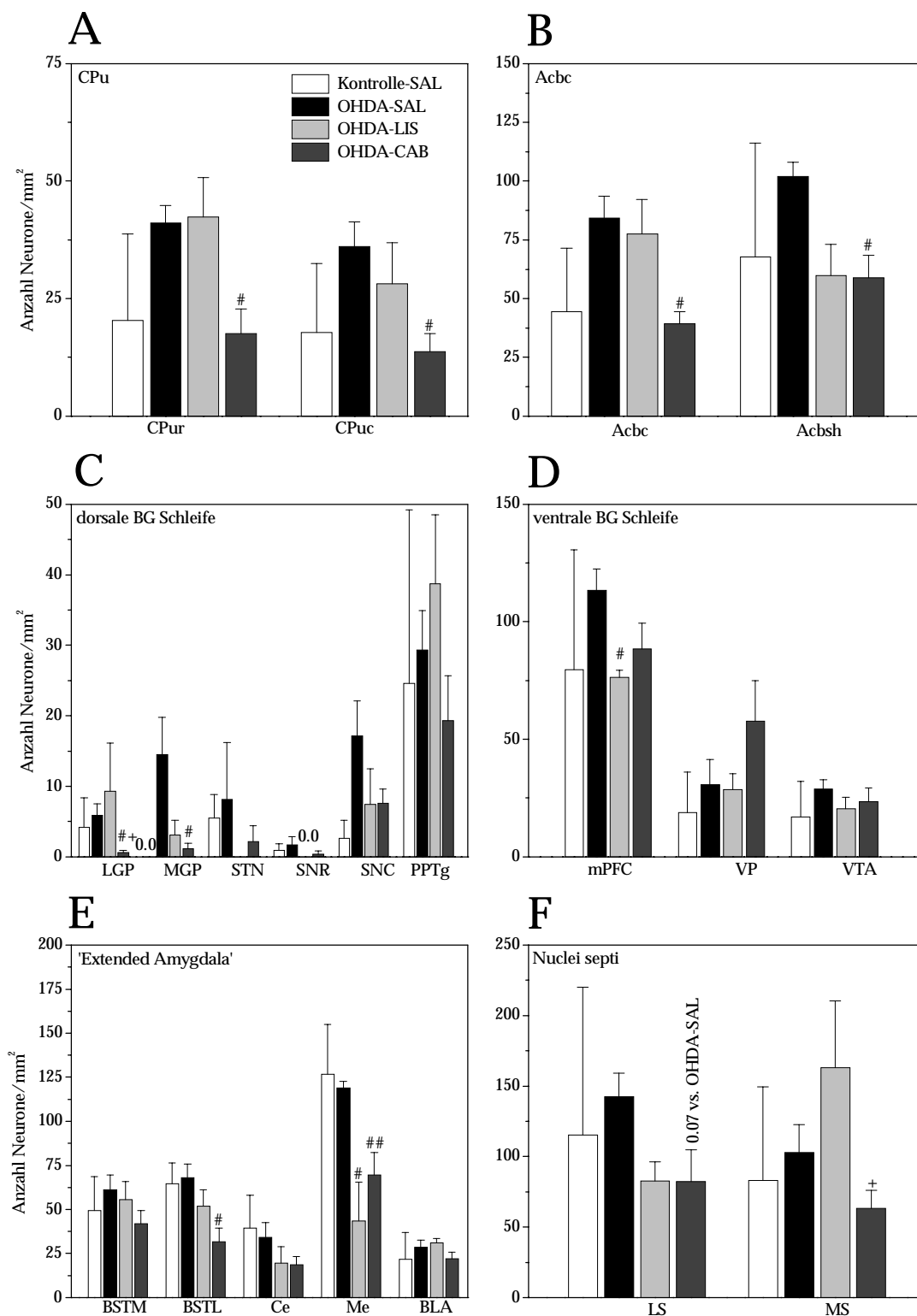


Abb. 34: Wirkung der chronischen Behandlung mit Cabergolin (N=6) und Lisurid (N=3) auf die numerische Dichte [Neurone/mm²] c-Fos-positiver Neurone im CPu (A); Acb (B), den Kernen der dorsalen (C) und ventralen (D) Basalganglien Schleife und des 'Extended Amygdala' Komplex (E) sowie dem Septum (F) nach intrastratialer 6-OHDA-Läsionen (N=5) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=2). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. OHDA-SAL; + $p < 0.05$ vs. OHDA-LIS (Kruskal-Wallis *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

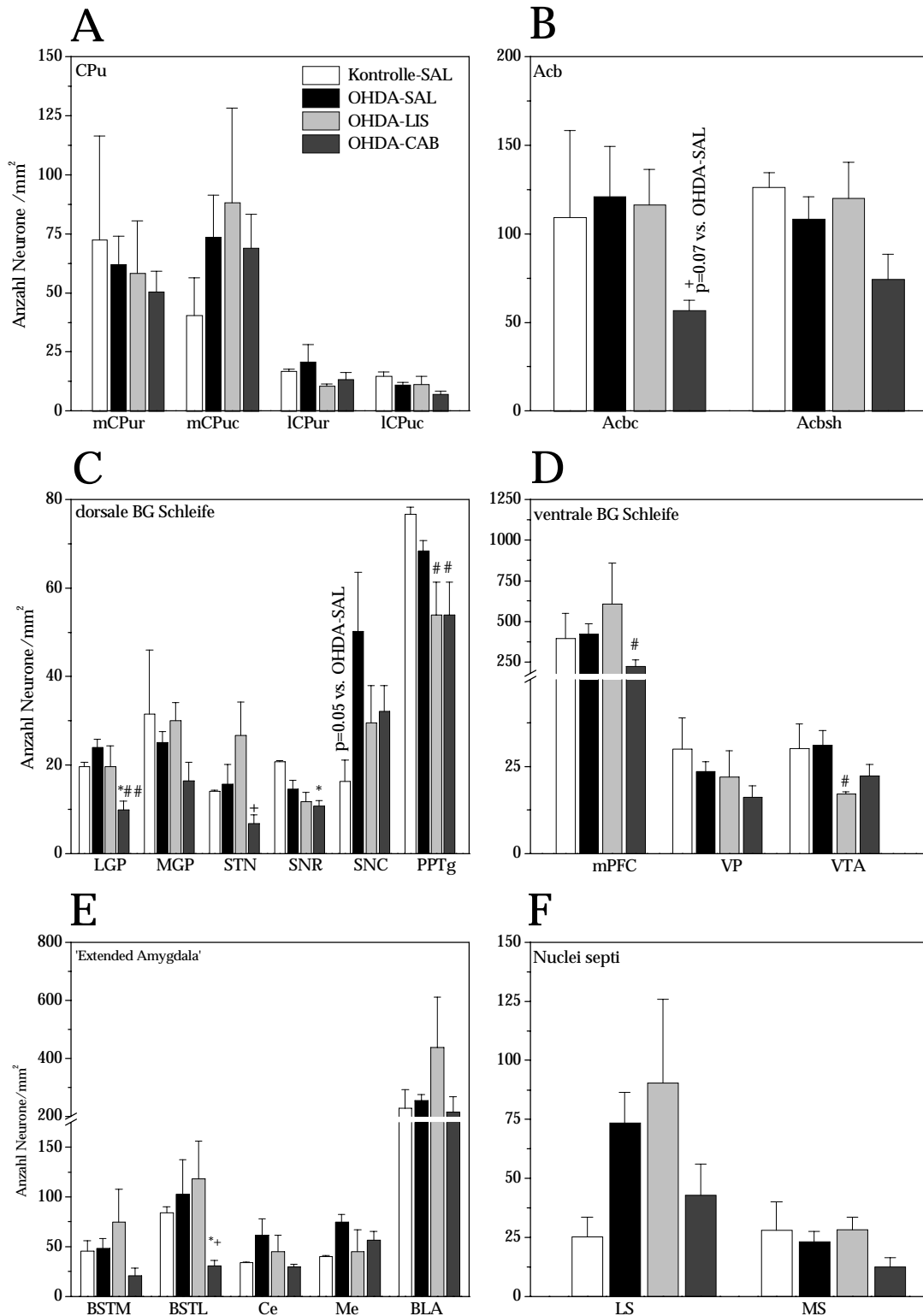


Abb. 35: Wirkung der chronischen Behandlung mit Cabergolin (N=6) und Lisurid (N=3) auf die numerische Dichte [Neurone/mm²] c-Jun-positiver Neurone im CPu (A); Acb (B), den Kernen der dorsalen (C) und ventralen (D) Basalganglien Schleife und des 'Extended Amygdala' Komplex (E) sowie dem Septum (F) nach intrastriatärer 6-OHDA-Läsionen (N=5) im Vergleich zu Kontrolltieren (N=2). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ vs. Kontrolle-SAL; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. OHDA-SAL; + $p < 0.05$ vs. OHDA-LIS (Kruskal-Wallis *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

Tabelle 9: Übersicht über die Veränderungen der striatalen DA-Rezeptor Bindungseigenschaften nach 6-OHDA-Läsion und chronischer Behandlung mit Lisurid und Cabergolin.

Behandlung	Rezeptordichte B_{max} [nM/mg Protein]		Bindungsaffinität K_d [nM]	
	D1	D2	D1	D2
Kontrolle-SAL	0.986±0.043	0.325±0.023	0.342±0.030	1.409±0.262
OHDA-SAL	1.093±0.058	0.365±0.026	0.34 ^a	1.414±0.093
OHDA-LIS	1.041±0.060	0.304±0.0161	0.411 ^a	1.269±0.083
OHDA-CAB	1.26±0.059*	0.432±0.044	n.d. ^a	2.189±0.43

Wirkung der chronischen Behandlung mit Lisurid (N=8) und Cabergoline (N=9) auf die striatalen DA-Rezeptordichten (B_{max}) [nM/mg Protein] und Bindungsaffinität (K_d) [nM] im Vergleich zur intrastriatalen 6-OHDA-Läsion (N=6-8) und Saline behandelten Kontrolltieren (N=8). Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M.; * $p < 0.05$ (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich). ^a Die Analysen konnten mangels Gewebe nicht für alle Tiere durchgeführt werden.

Tabelle 10: Übersicht über die qualitativen Zunahmen der c-Fos und c-Jun Expression nach intrastriataler 6-OHDA-Läsion und chronischer Behandlung mit Lisurid und Cabergolin.

Gehirnregion	c-Fos	c-Jun
Cortex cerebri		
LO/VO	OHDA-SAL: +; OHDA-LIS: +	-
AI/DII	-	-
PRh	OHDA-CAB: +	OHDA-SAL: +
Cg1/2	OHDA-SAL: +	OHDA-SAL: +; OHDA-LIS: +
M1/2	OHDA-CAB: +	OHDA-LIS: +
S1/2	OHDA-SAL: +	-
RSG/RSA	OHDA-SAL: +	OHDA-LIS: +; OHDA-CAB: +
Au1/AuD/AuV	OHDA-LIS: +	-
Ect	OHDA-SAL: +; OHDA-CAB: +	OHDA-SAL: +; OHDA-CAB: +
LEnt	OHDA-LIS: +	OHDA-SAL: +
Pir	OHDA-SAL: +	-
Telencephalon		
B	OHDA-LIS: +	OHDA-SAL: +
SI	OHDA-SAL: +; OHDA-LIS: +	OHDA-SAL: +
Diencephalon		
ZI	OHDA-SAL: +	-
LH	OHDA-SAL/LIS/CAB: +	-
PV	-	OHDA-SAL: +; OHDA-LIS: +
CM	OHDA-SAL: +; OHDA-LIS: +	OHDA-SAL/LIS/CAB: +
MD	-	-
Formatio hippocampi		
DG	OHDA-SAL: +	-
CA1	OHDA-SAL: +	-
CA2	-	-
CA3	-	OHDA-SAL/LIS/CAB: +

Wirkung der chronischen Behandlung mit Lisurid (N=3) und Cabergolin (N=6) auf die qualitative Expression von c-Fos und c-Jun nach 6-OHDA-Läsion (N=5) verglichen mit der Injektion von 0.1 % Ascorbat (N=2). Dargestellt ist die relative Zunahme der IR der angegebenen Behandlungsgruppe(n): - = keine Zunahme der IR; + = relative Zunahme. Für jedes Tier wurde zunächst die qualitative IR in der jeweiligen Region bewertet (3.9.1.) und daraus eine durchschnittliche qualitative IR für die Behandlungsgruppe ermittelt.

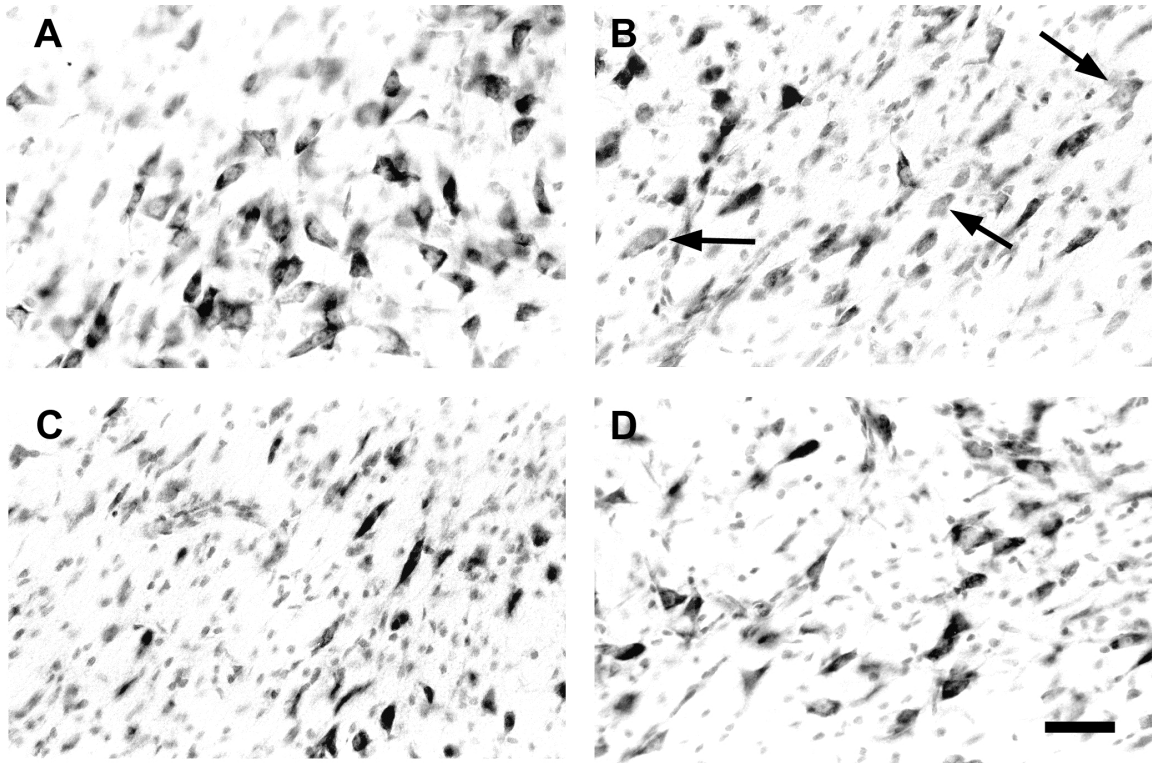


Abb. 36: Mikrophotographien der SNC (-5.60 mm kaudal von Bregma) 38 Tage nach bilateraler, intrastriatarer Infusion von 0.1 % Ascorbat (A) oder 6-OHDA (B) und den Effekt der anschließenden chronischen Behandlung mit Lisurid (C) und Cabergolin (D) auf die 6-OHDA-induzierte Degeneration. Die Nissl-Färbung zeigt einen deutlichen Neuronenverlust und Gliose nach 6-OHDA-Läsion mit einer geringen Zunahme der neuronalen Packungsdichte nach Cabergolinbehandlung (D). Neben zellulärer Atrophie zeigen viele der verbleibenden Neurone der SNC eine Abnahme der zytoplasmatischen Nisslsubstanz sowie ein Verlust der Kernkompartimentierung (Pfeile). Diese pathomorphologischen Veränderungen erscheinen nach der Cabergolinbehandlung qualitativ weniger stark ausgeprägt. Masstab = 40 μ m.

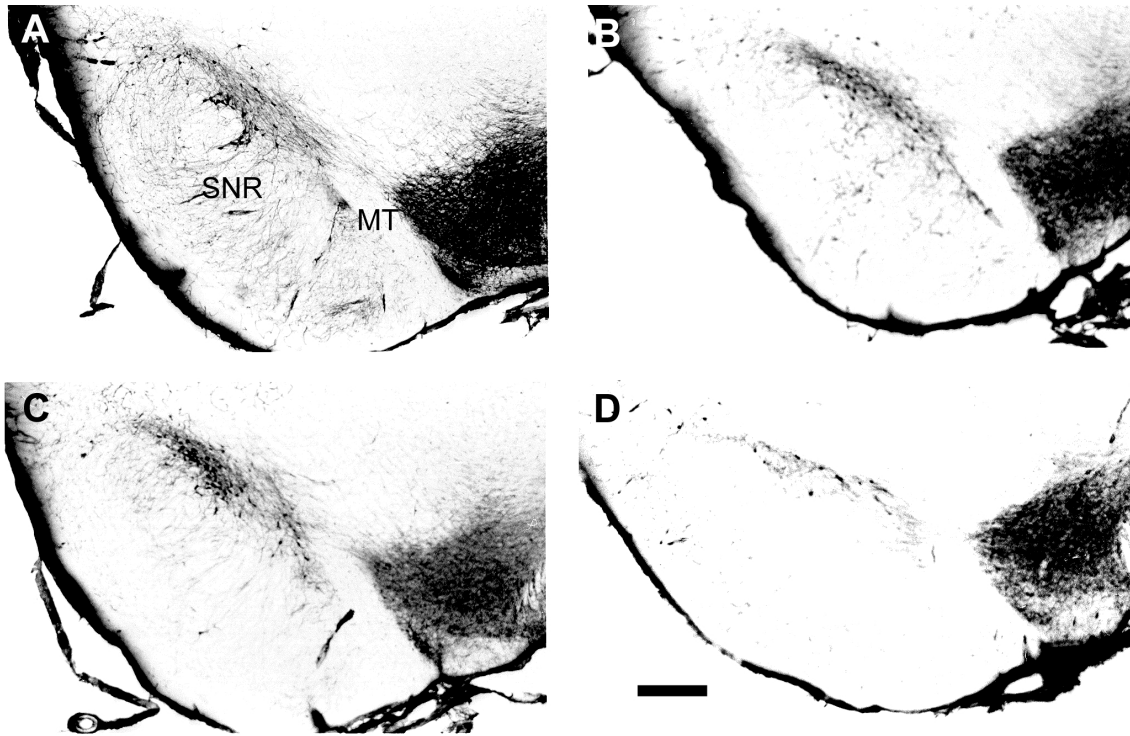


Abb. 37: Mikrophotographien koronaler Schnitte des ventralen Mesencephalons (-5.20 - -5.40 mm kaudal von Bregma) zeigen den Verlust TH-positiver Neurone in der SNC 38 Tage nach bilateraler intrastriataler Infusion von 6-OHDA (B) verglichen mit der Infusion von 0.1 % Ascorbat (A) und die Effekte der chronischen Behandlung mit Lisurid (C) und Cabergolin (D). Deutlich wird die Verminderung TH-positiver Neurone in der SNC sowie die Abnahme TH-positiver Fasern in die benachbarte SNR nach der Behandlung mit Cabergolin. MT, Nucleus terminalis des akzessorischen optischen Systems; SNR, Substantia nigra pars reticulata. Masstab = 230 μ m.

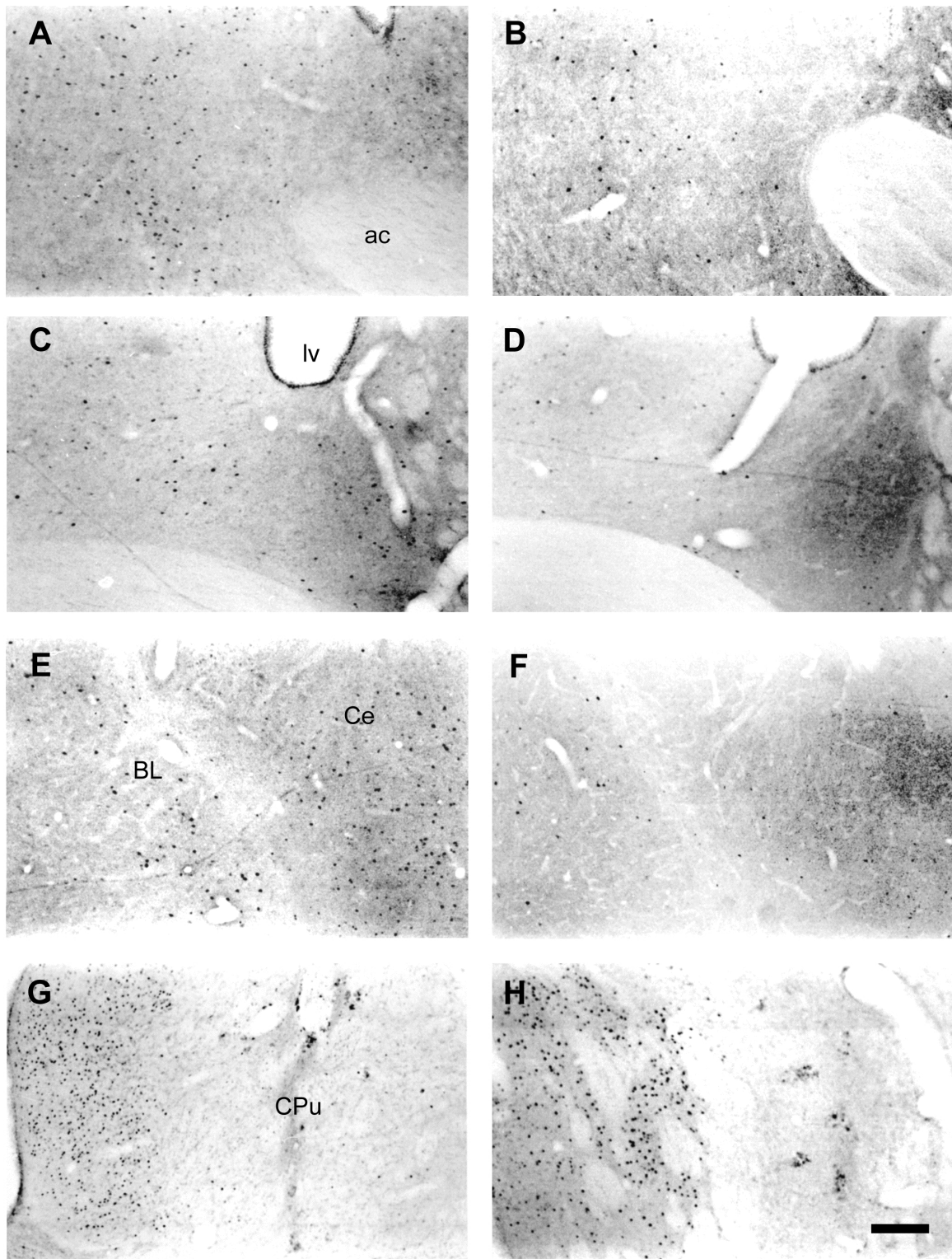


Abb. 38: Mikrophotographien koronaler Schnitte die eine Reduktion der 6-OHDA-bedingten (A, C, E) c-Fos IR nach chronischer Behandlung mit Cabergolin (B, D, F) im Acb (A, B), dem BSTL (C, D) und der Ce und der BL (E, F) zeigen. Im Vergleich dazu, ist die c-Jun IR im dorsomedialen CPu nach intrastriatler Injektion 6-OHDA (G) durch Cabergoline (H) unbeeinflusst. ac, Commissura anterior; BL, Corpus amygdaloideum nucleus basolateralis; Ce, Corpus amygdaloideum nucleus centralis; CPu, Nucleus caudatus/Putamen; lv, lateraler Ventrikel. Massstab = 170 μ m

5.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Nachfolgend wird eine Zusammenfassung der Effekte der Behandlung mit den DA D2-Rezeptor-Agonisten Lisurid und Cabergolin über 28 Tage auf die 6-OHDA-Läsions-induzierten Veränderungen gegeben.

1. Keiner der beiden DA-Agonisten zeigte eine antikataleptische Wirkung auf die 6-OHDA-induzierte spontane Katalepsie; die Behandlung mit Lisurid verursachte eine Zunahme der Katalepsie 37 Tage nach 6-OHDA-Läsion.
2. Die nach der 6-OHDA-Läsion reduzierte spontane Vorwärtslokomotion, vertikale Exploration und das Schnüffelverhalten blieb durch die Behandlung mit den DA-Agonisten unbeeinflusst. Alle Verhaltensparameter im ‚open field‘ und der Experimentierkammer habituierten bei den Kontrolltieren als Folge wiederholten Testens; diese Habituation war nach 6-OHDA-Läsion reduziert und wurde durch die Behandlung mit den DA-Agonisten nicht wiederhergestellt, mit Ausnahme der ‚Drehungen‘ in der Experimentierkammer.
3. Die akute Injektion von Lisurid induzierte eine starke Abnahme der vertikalen Exploration und eine Zunahme stereotypen Schnüffeln. Wiederholtes Testen nach chronischer Behandlung mit Lisurid konnte eine Zunahme der Lisurid-induzierten Vorwärtslokomotion zeigen; weder die akute noch die chronische Behandlung mit Cabergolin hatte derartige psychotomimetischen und verhaltenssensitivierenden Effekte zur Folge.
4. Die akute Injektion von Apomorphin löste 8 Tage nach 6-OHDA-Läsion verstärktes stereotypes Schnüffeln aus, was im ‚open field‘ als Zunahme der Immobilität deutlich wurde; diese Unterschiede blieben nicht über den Beobachtungszeitraum erhalten und waren unbeeinflusst durch die Behandlung mit den DA-Agonisten.
5. Die chronische Behandlung mit Cabergolin nach intrastriatler 6-OHDA-Läsion hatte eine relative Zunahme der striatalen DA D1- und D2-Rezeptoren im Vergleich zu den Kontrolltieren zur Folge.
6. Die chronische Behandlung mit den DA-Agonisten blieb auf die 6-OHDA-bedingte DA-Entleerung im CPu (~ 57 %) ohne Einfluss. Im Acb waren die Gewebegehalte von DA sowie der Metaboliten DOPAC und HVA nach chronischer Behandlung mit Cabergolin erhöht, ohne Einfluss auf den DA-Metabolismus. Weiterhin induzierte die intrastriatle 6-OHDA-Läsion eine Zunahme der 5-HT-Transmission im Acb, die nach Cabergolin Behandlung erhalten blieb.
7. Korrelierend mit dem Verlust DAerger Innervation im CPu, führte die bilaterale intrastriatle 6-OHDA Injektion nach 38 Tagen zu einem Verlust TH-positiver Neurone in der SNC (~ 40 %), ohne weitere Effekte der DA-Agonisten. Im Gegensatz dazu, hatten beide Agonisten einen protektiven Einfluss auf die 6-OHDA-induzierten Verlust von Nissl-gefärbten Neuronen in der SNC dem VTA.
8. Die chronische Behandlung mit den DA-Rezeptor-Agonisten Lisurid und Cabergolin hatte konsistent reduzierende Wirkung auf die 6-OHDA-verbundene Expression der iTFs c-Fos und c-Jun in den Eingangs- (CPu, Acb) und Ausgangskernen (MGP) der dorsalen und ventralen Basalganglienschleifen, sowie im VTA und dem LGP (Abb. 39). Entsprechende Effekte hatten Lisurid und Cabergolin in den mit den Basalganglien eng

assozierten Kernen der EA (BSTL, Me), dem PPTg, und dem mPFC auf die anhaltende Expression von c-Fos und c-Jun (Abb. 39)

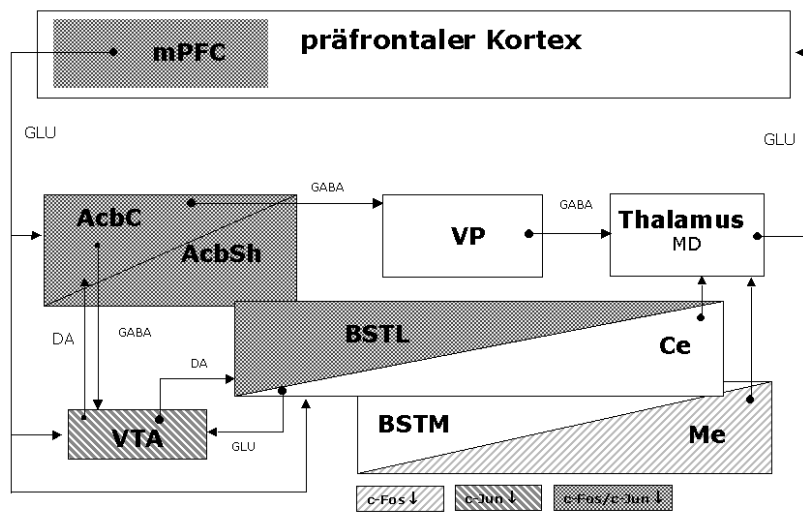
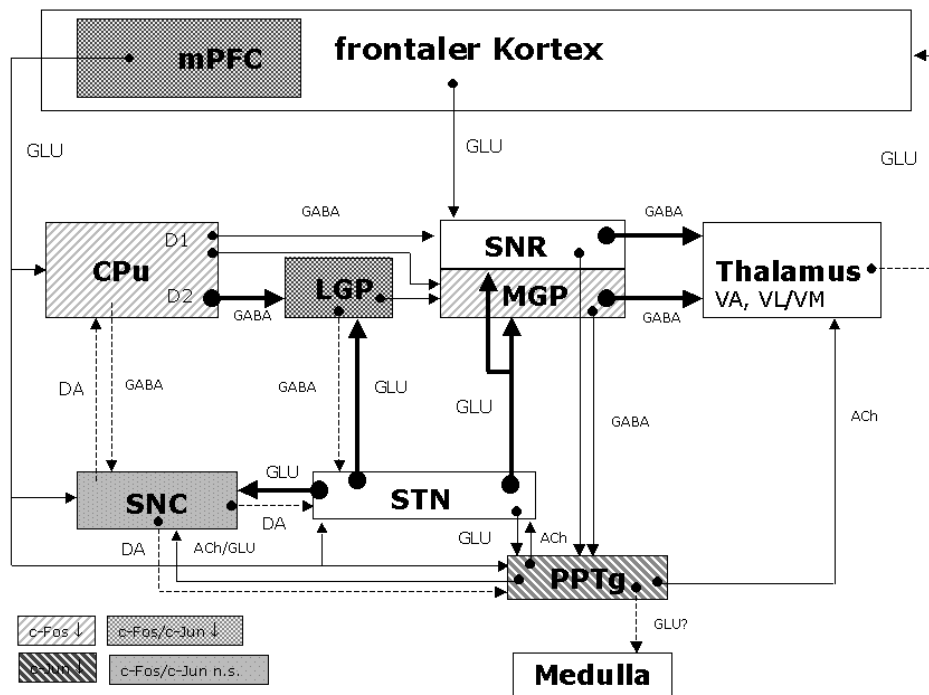


Abb. 39: Zusammenfassende Darstellung der Effekte der chronischen Behandlung mit Cabergolin auf die 6-OHDA-bedingte Expression der iTFs c-Fos und c-Jun in der dorsalen und ventralen Schleife der Basalganglien 38 Tage nach bilateraler intrastriärer 6-OHDA Injektion. Acbc, Nucleus accumbens core Region; Acbsh, Nucleus accumbens shell region; BSTL/M, Nucleus interstitialis striae terminalis laterale/mediale Division; Ce/Me, Corpus amygdaloideum nucleus centralis/medialis; CPu, Nucleus caudatus/Putamen; LGP, Globus pallidus pars lateralis; MD; Nucleus mediodorsalis thalami; MGP, Globus pallidus pars medialis; PPTg, Nucleus tegmental; STN, Nucleus subthalamicus; VP, Pallidum ventrale; VA/VL/VM, Nucleus ventroanterior/ventrolateralis/ventromedialis thalami; ACh, Acetylcholin; DA, Dopamin; GABA, γ-Aminobuttersäure; GLU, Glutamat; Dicke Pfeile: Überaktivität; gestrichelte Pfeile: Unteraktivität (nach Pedersen und Schmidt, 2000a; Schmidt et al., 1992, ergänzt nach Alheid et al., 1995; Alheid und Heimer, 1988).

5.5. Diskussion

In diesem Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass die chronische Behandlung mit dem kurzwirksamen DA D2-Rezeptor-Agonisten Lisurid über 4 Wochen nach einer partiellen bilateralen striatonigralen Läsion zu einer Verstärkung der lokomotorischen Verhaltensantwort bei wiederholter Substanzgabe und wiederholtem Testen führt. Die Behandlung mit dem langwirksamen DA D2-Rezeptor-Agonisten Cabergolin induziert keine derartige Verhaltenssensitivierung und reduziert gleichzeitig die anhaltende Expression von c-Fos im dorsalen CPU und im Acb. Darüberhinaus bewirkt die Cabergolinbehandlung eine Zunahme der DAergen Transmission im Acb, hat aber keine Effekte auf den DA-Gehalt im dorsalen Striatum oder den 6-OHDA-induzierten Verlust DAerger Neurone im Mesencephalon, obwohl die Gesamtzahl der Neurone nach der Behandlung mit beiden DA-Agonisten erhöht war. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die kontinuierliche DA-Substitution mit Cabergolin die Läsions-bedingte, anhaltende veränderte neuronale Aktivität in Kernen der dorsalen und ventralen Basalganglien Schleife, sowie assoziierten Strukturen reduziert wird.

Effekte der DA-Agonisten auf die 6-OHDA-induzierten Verhaltensdefizite

Die Untersuchungen der Spontanaktivität und der Katalopies zeigen, dass bereits 8 Tage nach der 6-OHDA Injektion robuste Defizite in der Bewegungsinitiation sowie Rigor ausgeprägt sind, die einem mittelschweren DA-Verlust und damit einem frühen Stadium der Parkinson-Krankheit entsprechen (siehe 4.5.). Somit stellt die anschliessende Behandlung mit den DA-Agonisten einen ‚frühen‘ pharmakologischen Eingriff während der DAergen Denervation des Vorderhirns dar. Da weder die spontane Katalepsie noch die Abnahme der Spontanaktivität über den Beobachtungszeitraum progredient waren, ist hier davon auszugehen, dass die, für die Verhaltensausrprägung verantwortliche, neurochemisch gemessene DA-Entleerung (~ 57 %) im dorsalen Striatum bereits 8 Tage nach der Läsion erreicht war. Basierend auf der partiellen DA-Entleerung und den Verhaltensveränderungen zeigt die chronische Behandlung mit Cabergolin keine antiparkinsonoide Wirkung. Im Gegensatz dazu zeigten frühere Studien, dass eine akute Applikation von 0.25 mg/kg s.c. Cabergoline, die auch einer klinisch relevanten Dosierung entspricht (Blanchet, 1999), sowohl die Reserpin-induzierte Akinese bei der Maus aufheben kann (Miyagi et al., 1996b) als auch die MPTP—induzierten Parkinson-Symptome im Affen (Arai et al., 1996). Chronische Behandlungen mit 0.25 mg/kg s.c. Cabergolin über 4 Wochen führten ebenfalls zu einer Verringerung des MPTP-induzierten Parkinsonismus, mit einer geringen Toleranzausrprägung gegenüber der antiparkinsonoiden Wirkung (Calon et al., 1999; Grondin et al., 1996). Der fehlende Behandlungseffekt bei vorliegender Untersuchung ist daher nicht auf eine unzureichende Dosierung zurückzuführen, vielmehr scheint das Ausmass der Verhaltensdefizite nach partieller DA-Entleerung zu gering zu sein, um Nettoeffekte einer DA-Substitution nachweisbar zu machen. Insbesondere bei der Katalepsie kommt hinzu, dass der kontextabhängige Anteil bei wiederholtem Testen (siehe 4.5.) dem der 6-OHDA-induzierten Katalepsie entspricht, und somit der Bereich in dem eine tatsächliche Reduktion der Katalepsie messbar wäre, sehr gering ist.

Die Langzeitbehandlung mit 0.25 mg/kg s.c. Lisurid zeigt in diesem Modell der partiellen DA-Entleerung ebenfalls keine Effekte auf die veränderte Spontanaktivität, potenziert aber die 6-OHDA-induzierte Katalepsie. Verglichen mit einer früheren Studie, die zeigte dass Dosierungen von 0.1 – 1.0 mg/kg p.o. Reserpin-induzierten Rigor und Akinesie bei der Ratte antagonisiert (Colpaert, 1987), ist davon auszugehen, dass die eingesetzte Dosis antikataleptisch wirksam ist. Grundsätzlich handelt es sich um eine höhere Dosierung (Henry et al., 1999), verglichen mit dem Dosisbereich von 1.2 – 10 mg/Tag der bei Parkinson Patienten eingesetzt wird (LeWitt et al., 1983b; Rinne, 1989). Da der 2. Katalepsietest 24 h nach der letzten Substanzgabe durchgeführt wurde, und damit die Plasmalevel aufgrund der kurzen Eliminationshalbwertszeit von Lisurid niedrig waren, kann die erhöhte Katalepsie auf eine ‚end of dose akinesia‘ hindeuten, die sich allerdings nicht in einer verminderten Spontanaktivität der Tiere äusserte. Insgesamt lassen diese Befunde eine nur sehr eingeschränkte Aussage über die antiparkinsonoide Wirkung der beiden DA-Agonisten im eingesetzten Tiermodell zu.

Sensitivierung der Verhaltensantwort durch chronisch, pulsatile DA-Stimulation

Die vorliegenden Verhaltensexperimente zeigen, dass weder die akute, noch die wiederholte Behandlung mit einer antiparkinsonoiden Dosierung von Cabergolin Verhaltensstereotypen, noch eine Zunahme der Verhaltensantwort infolge wiederholter Substanzgabe und Testen induziert. Unter der Hypothese, dass diese Verhaltenssensitivierung bei der Ratte der Dyskinesie des MPTP-Affen und des Parkinson Patienten entspricht (Henry et al., 1998), unterstützen diese Befunde das bereits gezeigte antidyskinetische Wirkprofil der Substanz (Arai et al., 1996; Doucet et al., 1996; Grondin et al., 1996). Grondin und Kollegen zeigten zwar, dass die initialen Behandlungen mit Cabergolin akut stereotypes Verhalten und auch Dyskinesien in den Substanz-naiven MPTP-behandelten Affen auslöst, allerdings verschwanden diese Effekte während der Behandlung, während die antiparkinsonoide Wirkung erhalten blieb (Grondin et al., 1996).

Es wurde gezeigt, dass die verstärkte Verhaltensantwort auf eine DA-Rezeptorstimulation zunächst initiiert werden muss (‚priming‘). Hierfür scheint eine bis wenige initiiierende Behandlungen mit einem DA-Rezeptor-Agonisten z.B. Apomorphin oder L-DOPA ausreichend die spätere Verhaltenssensitivierung (verstärktes Rotationsverhalten) im unilateral 6-OHDA-lädierten Tier auszulösen (Henry et al., 1998; Pollack et al., 1997; Pollack und Strauss, 1999). Nach partieller striatonigraler Läsion löst die initiiierende Apomorphinbehandlung selbst geringfügig stereotypes Verhalten aus, die chronische, kontinuierliche DA-Rezeptorstimulation mit Cabergolin induziert im so ‚geprimten‘ Tier keine weitere Verhaltenssensitivierung aus. Dies spricht für das antidyskinetische Potential von Cabergolin, und wird durch eine aktuelle Studie unterstützt, die zeigte, dass eine chronische Behandlung mit Cabergolin bereits manifestierte LIDs im MPTP-behandelten Affen drastisch reduzierte, und darüberhinaus auch die Inzidenz für Dyskinesien bei erneuter Behandlung mit L-DOPA (Tahar et al., 2000).

Im Gegensatz dazu, zeigen die vorliegenden Befunde, dass die ‚geprimten‘ Tiere bereits bei der ersten Gabe von Lisurid eine starke Schnüffelstereotypie entwickeln, die über den Behandlungszeitraum erhalten bleibt. Vorangegangene Studien haben bereits darüber berichtet, dass die akute, lokale oder systemischen Injektion von Lisurid Hyperaktivität (Fink und Morgenstern, 1985; Hara et al., 1982), Verhaltensstereotypen (Horowski und Wachtel,

1976) sowie kontralaterales Rotationsverhalten und orofaziale Stereotypien in der unilateral 6-OHDA-lädierten Ratte (Fletcher und Starr, 1987) auslöst. Diese zeigt zunächst, dass Lisurid über ein psychotomimetisches Potential verfügt, das auch in der Parkinson Medikation als unerwünschte Nebenwirkung führt (Przuntek, 1988). Lokale Infusion von Lisurid in das Striatum, den Acb, den frontalen Kortex und weitere Gehirnregionen der unilateral 6-OHDA lädierten Ratte zeigten, dass die psychotrope Wirkung nicht ausschliesslich über striatale DA-Rezeptoren vermittelt wird (Fletcher und Starr, 1987), sondern vielmehr in Interaktion mit der 5-HT Transmission (Beart et al., 1986; Fink und Morgenstern, 1985; Hruska und Silbergeld, 1981; Marona-Lewicka et al., 2000) (siehe 1.4.1.). Weiterhin zeigen die Befunde eine Sensitivierung der Verhaltensantwort, insbesondere eine Zunahme der Lokomotion im Verlaufe der chronischen Behandlung bei wiederholtem Testen. Dieses Phänomen spricht dafür, dass die pulsatile DA-Rezeptorstimulation, im Gegensatz zur kontinuierlichen Stimulation mit Cabergolin, über ein dyskinetisches Potential verfügt und unterstützt die aktuelle Diskussion darüber, dass das pharmakokinetische und pharmakodynamische Profil von DA-Agonisten darüber bestimmt, ob Dyskinesien auftreten oder nicht (Bedard et al., 1999; Obeso et al., 1994). In diesem Zusammenhang zeigt die relative Zunahme der striatalen DA D1- und D2-Rezeptoren, die nach Denervation und der chronischen Behandlung mit Cabergolin aber nicht nach Behandlung mit Lisurid auftritt, dass das Auftreten von Verhaltenssensitivierung nicht mit der Zunahme der DA-Rezeptordichte oder einer Veränderung der Ligandenaffinität im dorsalen Striatum korreliert sein muss. Im Kontrast zu den hier erhobenen Befunden induzierte die fast komplette DA-Denervation nach MPTP-Behandlung eine Abnahme der striatalen DA D1-Rezeptor mRNA und Zunahme der D2 mRNA Rezeptordichten (Goulet et al., 1997; Grondin et al., 1996), wobei eine chronische Behandlung mit Cabergolin die erhöhte D2-Rezeptordichte reduzierte (Grondin et al., 1996). Diese Diskrepanz ist vermutlich auf das Ausmass der DA-Denervation zurückzuführen, da die partielle DA-Denervation selbst zu keiner Veränderung der striatalen DA-Rezeptordichte führt. Diese Vermutung wird durch zahlreiche Studien gestützt, die zeigten, dass nach unilateraler 6-OHDA-Läsion ‚supersensitives‘ Rotationsverhalten erst bei striatalen DA-Entleerungen von > 80 % messbar ist (Kirik et al., 1998, Zusammenfassung in Schwarting und Huston, 1996). Insgesamt wird die Frage der Rezeptorsupersensitivität kontrovers diskutiert. Bislang konnte weder im MPTP-behandelten Affen, noch bei Parkinson Patienten ein einfacher Zusammenhang zwischen LIDs und einer Zunahme der striatalen DA-Rezeptoren nachgewiesen werden (Zusammenfassung in Calon et al., 2000a). Dies macht deutlich, dass komplexere, intrazelluläre Mechanismen in das ‚Lernphänomen‘, das den LIDs bzw. DIDs zugrundegelegt wird, involviert sein müssen.

Verhaltenssensitivierendes Potential der DA-Agonisten und iTF Expression im Striatum

Die immunhistochemische Untersuchung der iTFs c-Fos und c-Jun im dorsalen und ventralen Striatum zeigen, dass die chronische Behandlung mit Cabergolin, jedoch nicht mit Lisurid, die 6-OHDA-assoziierte, anhaltende Expression von c-Fos im CPu und beiden Regionen des Acb reduziert, sowie zu einem geringeren Ausmass die chronische c-Jun Aktivierung im Acbc. Basierend auf der chronischen Induktion von c-Fos nach partieller bilateraler striatonigraler Degeneration (siehe 4.4.) wird hier postuliert, dass ein verändertes Gleichgewicht zwischen der DAergen und GLUergen Transmission zu einer veränderten

neuronalen Aktivität striataler und accumbaler Neurone führt. Dies steht im Einklang mit dem vorgeschlagenen Modell, dass zunächst die DAerge Denervation eine funktionelle Überaktivität der GLUergen kortikostriatalen Projektion zur Folge hat, und darüber chronische iTFs induziert werden, die zusätzlich durch pulsatile DA-Rezeptorstimulation verstärkt wird (Calon et al., 2000a). Dieses Modell beruht auf tierexperimentellen Befunden die zeigten, dass unilaterale MFB Läsionen mit 6-OHDA zu einer anhaltenden Erhöhung von FosB, Δ FosB, und JunD vorzugsweise in striatopallidalen Neuronen führt (Doucet et al., 1996; Vallone et al., 1997). ‚Priming‘ mit L-DOPA bzw. die chronische Behandlung mit DA-Agonisten erhöhte spezifisch die Aktivität von Δ FosB (Doucet et al., 1996; Vallone et al., 1997), wobei der ‚priming‘ Effekt auf das verstärkte Rotationsverhalten, als auch auf die Aktivierung von c-Fos oder Δ FosB durch die gleichzeitige Behandlung mit NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie MK-801 oder CPP unterdrückt wurde (Morelli et al., 1996; Pollack und Strauss, 1999; Vallone et al., 1997). Im MPTP-behandelten Affen induzierte eine pulsatile chronische Behandlung mit dem DA D1-Rezeptor-Agonisten SKF 82958 eine ausgeprägte Zunahme des Δ FosB Proteins im Striatum, korreliert mit der Ausprägung von Dyskinesien (Doucet et al., 1996). Entsprechend zeigten zwei weitere Studien eine anhaltende Expression von FosB Proteinen (inkl. Δ FosB) nach akuter und chronischer L-DOPA Behandlung in der unilateral 6-OHDA-lädierten Ratte (Andersson et al., 1999; Cenci et al., 1999). Die durch chronische L-DOPA-Behandlung induzierte Expression von FosB umfasste hauptsächlich striatonigrale Projektionsneurone, die im lateralen CPu gleichmässig auf das Matrix und Striosom-Kompartiment verteilt war, im medialen CPu dagegen auf die Striosomen beschränkt war (Cenci et al., 1999). Interessanterweise korrelierten diese regionspezifischen Expressionsmuster mit der Entwicklung von lokomotorischen AIMs (mediales CPu) bzw. axialen, orolingualen AIMs und AIMs der Vorderextremitäten (laterales CPu) (Andersson et al., 1999). Die Tatsache, dass sowohl die Striosomen als auch das laterale Matrix Kompartiment eine prominente GLUerge Innervation aus präfrontokortikalen (Gerfen, 1984) und primär sensorimotorischen (Donoghue und Herkenham, 1986; Kincaid und Wilson, 1996) Kortexregionen erhalten und insbesondere der laterale Anteil des CPu, der hauptsächlich aus der SNC DAerg innerviert wird (Zusammenfassung in Björklund und Lindvall, 1984), nach 6-OHDA-Läsion eine veränderte Transmitterbalance erfährt, unterstützt das Modell der GLU-getriebenen Entwicklung der DIDs (Calon et al., 2000a). Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine DA-Denervation zur verstärkten Tyrosin Phosphorylierung der NR2B-Untereinheit (SU) des NMDA-Rezeptors führt (Menegoz et al., 1995), die durch eine chronische L-DOPA Behandlung weiter verstärkt wurde (Oh et al., 1998). Eine akute Behandlung mit dem NR2B-Antagonisten ACEA 10-1244 verhinderte sowohl die L-DOPA induzierte Tyrosine Phosphorylierung, als auch die Veränderung der Verhaltensantwort (hier verlängertes Rotationsverhalten) (Oh et al., 1998). Weiterhin wurde gezeigt, dass die DA-Rezeptor vermittelte Serine Phosphorylierung der NR2A-SU ebenso wie die Verhaltenssensitivierung nach chronischer intermittierender Stimulation im DA-denervierten Tier abhängig ist von der Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Protein Kinase II (CaMKII) (Oh et al., 1999). Da diese Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion wiederum eine Schlüsselrolle bei den intrazellulären Prozessen der LTP spielt (aktuelle Zusammenfassung in Malenka und Nicoll, 1999) wird hierdurch der plastische Charakter

der Verhaltenssensitivierung und damit der DIDs im Sinne eines pathologischen Lernprozess unterstützt.

In Ergänzung zu diesen Studien zeigen vorliegende Befunde deutlich, dass auch das als eher transient anzusehende iTF c-Fos in Folge der DA-Denervation und des ‚primings‘ mit Apomorphin über einen Zeitraum von 4 Wochen im CPu und auch Acb verstärkt exprimiert wird. Grundlage für die anhaltende Aktivierung ist vermutlich der Zeitverlauf der nigrostriatalen Degeneration, die im Tiermodell der partiellen striatonigralen Läsion als voranschreitender Prozess anzusehen ist (siehe 4.5.). Die Folge ist ein sich dynamisch verändernde Transmitterbalancen, die wiederum einen ständig neuen Stimulus für die c-Fos Induktion darstellt. Im Gegensatz dazu wurden angeführte Studien an Versuchstieren mit fast kompletter DA-Denervation durchgeführt, so dass von einem eher stabilen Endzustand des Transmittergleichgewichts auszugehen ist und daher die chronischen iTFs wie FosB und Δ FosB als Marker für eine veränderte neuronale Funktion anzusehen sind. Damit kann hier gezeigt werden, dass auch die anhaltende Expression c-Fos ein valider Marker für chronische, adaptative intrazelluläre Prozesse ist, vorausgesetzt der dafür erforderliche Stimulus unterliegt einer anhaltenden Veränderung.

Unabhängig davon, welche iTFs wiederholt stimuliert werden oder chronisch aktiviert bleiben, liegt es nahe, dass dies zu einer langfristigen AP-1-abhängigen (Auf)regulation von Zielgenen in den striatalen Projektionsneuronen führt. Die Gene von Präprodynorphin (PPT) und Präproenkephalin (PPE) enthalten beide AP-1-Bindungssequenzen (Messersmith et al., 1994; Sonnenberg et al., 1989) und können somit durch die iTFs der Fos- und Jun-Genfamilie selektiv reguliert werden. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass sowohl unilaterale 6-OHDA-Läsionen als auch MPTP-Behandlung eine Zunahme der PPE mRNA und eine Abnahme der PPT mRNA im Striatum induzieren (Gerfen et al., 1990; Henry et al., 1999; Herrero et al., 1995; Morissette et al., 1999; Zeng et al., 2000). Die chronische Behandlung mit L-DOPA nach 6-OHDA-Läsion konnte die Zunahme der PPE mRNA reduzieren und die PPT mRNA Abnahme komplett normalisieren (Zeng et al., 2000). Im MPTP-behandelten Affen sowie im Parkinson Patienten blieb die PPE mRNA nach L-DOPA Behandlung erhöht, die PPT mRNA unterschied sich nicht von den Kontrollen (Herrero et al., 1995; Nisbet et al., 1995). Weiterhin wurde gezeigt, dass DIDs, hervorgerufen durch chronische Behandlung mit L-DOPA oder die pulsatile Applikation des DA D1-Rezeptor-Agonisten SKF 82958, mit einer zusätzlichen Zunahme der striatalen PPE mRNA Gehalte korrelierte (Morissette et al., 1999; Zeng et al., 2000). Im Vergleich dazu normalisierte die chronische, kontinuierliche DA-Rezeptorstimulation mit Cabergolin die PPE und PPT mRNA Level, ohne Dyskinesien auszulösen bei anhaltender antiparkinsonoider Wirkung (Morissette et al., 1999). In der unilateral 6-OHDA lädierten Ratte war das Auftreten von DIDs nach pulsatilem DA-Stimulation assoziiert mit einer Zunahme der PPT mRNA und der GLU Dekarboxylase (GAD67) mRNA bzw. deren Aktivität im dorsalen CPu sowie GAD67 mRNA im LGP (Cenci et al., 1998; Cenci et al., 1999; Engber et al., 1991). Die kontinuierliche Infusion von L-DOPA führte zu einer Normalisierung von GAD67 Aktivität und dem Gehalt an Dynorphin führte (Engber et al., 1991). Ähnlich war die Zunahme des Rotationsverhaltens nach chronischer pulsatilem L-DOPA Behandlung assoziiert mit der Zunahme von striataler PPE mRNA (Henry et al., 1999). Im Gegensatz dazu induzierte die chronische Behandlung mit Lisurid (0.01 mg/kg und 0.1 mg/kg b.i.d.) kein verstärktes Rotationsverhalten als Anzeichen einer

Verhaltenssensitivierung und normalisierte den striatalen PPE mRNA Gehalt (Henry et al., 1999). Zusammengenommen zeigen diese Studien, dass das Auftreten von Dyskinesien bzw. entsprechender Verhaltenssensitivierung im DA-denervierten Tier nach pulsativer DA-Rezeptorstimulation an einen veränderten physiologischen Zustand des Striatums gebunden ist (Engber et al., 1991), der, worauf die bisherigen Befunde hindeuten, vorzugsweise die striatopallidale Projektion betrifft. In vorliegendem Experiment wird deutlich gezeigt, dass die chronische Behandlung mit Cabergolin die 6-OHDA-induzierte anhaltende Aktivierung von c-Fos im dorsalen CPU und auch im ventralen Striatum normalisiert und keine Verhaltenssensitivierung induziert. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass die kontinuierliche DA D2-Rezeptorstimulation einen physiologische DAergen Tonus gegenüber der relativen GLUergen Überaktivität wiederherstellt, und somit die normale Funktion striataler Projektionsneurone.

Kompensatorische und neuroprotektive Effekte der DA-Rezeptor-Agonisten

Die hier durchgeführte histologische Untersuchung zur Bestimmung des Neuronenverlustes in ventralen Mesencephalon zeigt, dass die chronische Behandlung mit den DA-Agonisten keine protektiven Effekte auf die DAergen Neurone in der SNC hat. Korrespondierend dazu wird neurochemisch im dorsalen CPU eine DA-Entleerung von ~ 57 % der Kontrolle nachgewiesen, auf die die DA-Agonisten keinen Einfluss haben. Somit können vorliegende Ergebnisse einen unmittelbaren protektiven Effekt einer frühen kontinuierlichen Behandlung mit DA-Agonisten auf DAerge Neurone (Olanow et al., 1998) und damit auf die DAerge Transmission im dorsalen Striatum nicht unterstützen. Die Zunahme des DA-Metabolismus (Metaboliten/Transmitter-Verhältnis) im CPU nach 6-OHDA-Läsion ist Ausdruck eines kompensatorischen Prozess, der eine erhöhte Aktivität überlebender Neurone und deren Terminalen kennzeichnet (Hefti et al., 1985; Robinson und Wishaw, 1988; Zigmond et al., 1990). Diese intrinsische Fähigkeit DAerger Neurone nach nigrostriataler Läsion wird auf eine funktionelle Transformation zurückgeführt, die extrazelluläre Transmitterspiegel auch nach extensiver Läsion weitestgehend normalisiert und auch so Verhaltensdefizite lange Zeit kompensiert (Robinson und Wishaw, 1988, Zusammenfassung in Bezard und Gross, 1998). Der DA-Metabolismus zeigt nach chronischer Behandlung mit Lisurid eine geringere kompensatorische Kapazität, was möglicherweise die ausgeprägte Zunahme der Katalepie in diesen Tieren nach Ende der Behandlung erklärt. Die chronische Behandlung mit Cabergolin hingegen hält diese kompensatorischen Mechanismen aufrecht, so dass sich an dieser Stelle mutmassen lässt, dass eine Wiederherstellung des physiologischen DA-Tonus auch kompensatorische Mechanismen fördert. In diesem Zusammenhang ist der Befund, dass die DAerge Transmission im Acb nach der chronischen Behandlung mit Cabergolin zunimmt ebenfalls als kompensatorisches Phänomen anzusehen. Da hierbei keine Zunahme des präsynaptischen DA-Metabolismus (DOPAC/DA) gemessen wird, deutet dies auf eine Zunahme DAerger Terminalen im Acb hin und damit auf das plastische Phänomen des axonalen ‚sprouting‘. Spontanes ‚sprouting‘ im Sinne von Ausbildung zusätzlicher Axonkollateralen und neuer Synapsen nach unvollständiger aber auch schwerer DAerger Denervation infolge 6-OHDA-Läsion der SNC oder MPTP-Behandlung wurde im CPU mittels morphologischer, biochemischer und ultrastruktureller Untersuchung der DAergen Terminalen gezeigt (Bezard et al., 2000; Blanchard et al., 1996; Finkelstein et al., 2000; Onn et al., 1986; Song und Haber, 2000). Dieses Phänomen trat frühestens 4 Monaten nach der 6-

OHDA-Läsion auf (Blanchard et al., 1996; Finkelstein et al., 2000; Onn et al., 1986) und ist daher als eher chronischer, kompensatorischer Mechanismus anzusehen (Bezard und Gross, 1998). Dagegen werden hier 5 Wochen nach partieller striatonigraler Läsion im CPu schnelle kompensatorische Mechanismen wie ein erhöhter DA-Umsatz nachgewiesen. Studien an MPTP-behandelten Affen zeigten, dass die DA-Denervation im Acb nie das Ausmass der striatalen Entleerung erreicht, und hier am ehesten DAerge Reinnervation (hier Normalisierung des HVA/DA Verhältnis) stattfindet (Elsworth et al., 2000), die möglicherweise auch zur langfristigen Wiederherstellung motorischer Funktionen nach akuter MPTP-Behandlung beiträgt (Rose et al., 1989). Vorliegende Untersuchung unterstützt die Vermutung, dass das mesoaccumbale DA-System weniger vulnerabel gegenüber der Wirkung der Neurotoxine ist. Darüberhinaus wird hier zum ersten Mal gezeigt, dass die kontinuierlich DA-Rezeptorstimulation mit Cabergolin spezifisch mesoaccumbale Axone DAerger Projektionsneurone zum Wachstum stimuliert. Der zugrundeliegende Mechanismus ist unbekannt, wahrscheinlich ist jedoch eine Beteiligung neurotropher Faktoren (NTFs). Es wurde gezeigt, dass BDNF (brain derived neurotrophic factor) und GDNF (glial cell derived neurotrophic factor) DAerges ‚sprouting‘ im Striatum und GP nach 6-OHDA-Läsion unterstützen (Batchelor et al., 2000; Kirik et al., 2000; Rosenblad et al., 1999; Rosenblad et al., 2000a). Weiterhin impliziert die Koexpression von DA D2-Autorezeptoren und verschiedenen NTFs im somatodendritischen und axonalen Bereich mesencephaler Neurone (Bozzi und Borrelli, 1999 und Referenzen hierin) eine Interaktion, wobei bisher nicht bekannt ist, ob und wie DA die Expression und Funktion von NTFs und deren Rezeptoren beeinflusst. Eine Studie an D2-Rezeptor knockout Mäusen zeigte eine generelle Abnahme der mRNAs von NT-4 (Neurotrophin-4) und GDNF im Striatum, was darauf hindeuten mag, dass die Expression dieser beiden NTFs abhängig ist von der DAergen Signaltransduktion über D2-Rezeptoren. Im Umkehrschluss würde das bedeuten, dass eine Stimulation der somatodendritischen und axonalen D2-Autorezeptoren durch DA-Agonisten wie Cabergolin eine verstärkte Expression und Freisetzung von GDNF und NT-4 induzieren kann, was wiederum das DAerge ‚axonal sprouting‘ fördert. Die Selektivität für das mesoaccumbale System mag dadurch erklärt werden, dass dessen intrinsische Kapazität zur Regeneration aufgrund der geringen Degeneration der Somata und Terminalen erhalten bleibt. Von der Behandlung unbeeinflusst bleibt das serotonerge ‚sprouting‘ im Acb nach 6-OHDA-Läsion. Serotonerges ‚sprouting‘ wurde bisher im CPu und der SNC nach MPTP-Behandlung oder 6-OHDA-Läsion der SNC gezeigt (Gaspar et al., 1993; Luthman et al., 1987; Zhou et al., 1991) jedoch nicht im Acb, wo in MPTP-behandelten Mäusen sogar eine chronische Degeneration der serotonergen Transmission nachgewiesen wurde (Date et al., 1990). Das Phänomen des heterotypen Kollateralen ‚sprouting‘ deutet darauf hin, dass nicht nur das DAerge System in den Basalganglien ein plastisches Potential bei der Parkinson Krankheit besitzt, sondern dass die kompensatorischen Mechanismen während des Krankheitsverlaufs vielfältig sind, teilweise gebunden an die Aktivität nigraler Afferenzen (Bezard und Gross, 1998).

Obwohl vorliegende histologische Untersuchungen keine Protektion DAerger Neurone im ventralen Mesencephalon zeigen können, ist die Anzahl der Nissl-gefärbten Neurone in der SNC und auch im VTA nach der chronischen Behandlung mit den DA-Agonisten gegenüber den unbehandelten Tieren erhöht. Da es sich hierbei aufgrund der morphologischen

Betrachtung um mittlere bis grosse Projektionsneurone handelt, kann der Schluss gezogen werden, dass es sich hierbei mit grosser Wahrscheinlichkeit um ehemals TH-positive Neurone handelt, die das Enzym nicht mehr nachweisbar exprimieren. Zwei behandlungsbedingte Ursachen sind hierfür denkbar.

Der Verlust der TH IR kann ein Teil des degenerationsbedingten Funktionsverlustes sein der im Verlauf der akuten bis chronischen Degenerationsphase auftritt (siehe 4.5.). Dies würde durch bereits beschriebene ultrastrukturelle Untersuchungen bestätigt, die zeigten, dass der Verlust der TH IR der eigentlichen Degeneration vorangeht (Ichitani et al., 1994; Marti et al., 2000; Zuch et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass im Zeitverlauf nach der striatalen 6-OHDA Injektion der Verlust der TH IR nach 10 – 15 Tage am grössten war und der eigentlichen Degeneration unmittelbar vorausgeht (Marti et al., 2000). Demnach würde die Behandlung mit den DA-Agonisten die den Verlust der TH IR verzögern und möglicherweise auch die Degeneration. Fraglich hingegen ist jedoch, ob dies eine tatsächliche langfristige Neuroprotektion darstellt.

Da die Nissl-gefärbten, TH-negativen Neurone weder atrophiert waren oder ‚aufgelöste‘ Zellkörper und eine undeutliche Kernmembran aufwiesen (siehe 4.5.), sondern morphologisch eher den Neuronen der intakten SNC glichen, scheint der Verlust der TH IR nicht unmittelbar mit einem degenerativen Prozess assoziiert zu sein. Sowohl die Aktivität, als auch die Genexpression der TH sind komplex reguliert, um die Biosynthese der Catecholamine auf die jeweiligen physiologischen Funktionen anzupassen und das Risiko zytotoxischer Reaktionen, die durch deren Autoxidation ausgelöst werden können, zu minimieren (Zusammenfassung in (Kumer und Vrana, 1996). Der Verlust der TH IR in überlebenden Neuronen kann durch eine DA-Agonisten-induzierte negative Regulation der Transkription des TH-Gens oder der Translation der mRNA erklärt werden. In diesem Zusammenhang wurde unlängst gezeigt, dass eine kontinuierliche systemische bzw. intrazerebrale Behandlung mit Apomorphin über 7 bzw. 28 Tage ebenfalls eine Abnahme der TH mRNA im intakten ventralen Mesencephalon bewirkt, eine diskontinuierliche systemische Applikation im Vergleich dazu jedoch nicht (Iwata et al., 2000), was im Einklang zu der vorliegenden Beobachtung steht. Naheliegend wäre eine unmittelbare Regulation der Genexpression über eine Stimulation von somatodendritischen oder axonalen DA D2-Autorezeptoren auf nigrostriatalen Neuronen (Cragg und Greenfield, 1997; Filloux et al., 1988), die nicht nur die DA-Freisetzung inhibieren, sondern über intrazelluläre Signaltransduktion die Enzymmenge regulieren. Verschiedene regulatorische Elemente im Promotor des TH-Gens sind bekannt, die mit der DA D2-Rezeptor gekoppelten Signalkaskade in enger Verbindung stehen. So kann die Aktivierung der Adenylylcyclase über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Phosphorylierung des cAMP responsive element binding Protein (CREB) führen, das dann wiederum an das entsprechende CRE im Promotorbereich bindet und somit die Transkription aktiviert (Piech-Dumas und Tank, 1999). Das PKA System scheint unter den meisten physiologischen Bedingungen die Genexpression der TH zu kontrollieren (Kumer und Vrana, 1996). Daneben hat auch die Aktivierung von c-Fos und c-Jun über die AP-1 Bindungsstelle eine wichtige regulatorische Funktion (Guo et al., 1998; Icard-Liepkalns et al., 1992), wobei die Aktivierung dieser Signalkaskaden eine positive Regulation des TH-Gens bewirkt. Möglicherweise besteht hier jedoch ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der 6-OHDA-induzierten c-

Fos und c-Jun Expression nach chronischer DA-Rezeptorstimulation. Denkbar wäre eine kompensatorische Aufregulation der TH Expression nach 6-OHDA über die chronische AP-1 Aktivierung die dann wiederum in Folge der chronischen DA D2-Rezeptorstimulation inhibiert wird. Weiterhin kann die Aktivierung negativ regulatorischer Elemente im TH-Gen, die bereits identifiziert sind, die Transkription inhibieren. So bindet der Transkriptionsfaktor Oct-2 im Genpromotor um die Transkription zu unterdrücken (Dawson et al., 1994), allerdings ist hierfür noch kein Verbindung mit D2-Rezeptor-gekoppelten Signalkaskaden bekannt. Die Oct-2 Erkennungssequenz im TH-Gen wird jedoch von der CRE und AP-1 Bindungssequenz flankiert, eine teilweise Überlappung der Sequenzen (Kumer und Vrana, 1996) macht eine Koregulation dieser negativen Transkriptionskontrolle über den PKA- bzw. AP-1 Signaltransduktionsweg erwäglich. Trotzdem kann über eine negativen Regulation der TH Expression über DA D2-AutoRezeptorstimulation derzeit nur spekuliert werden.

Unter dem Aspekt, ob eine DA-Substitution mit DA D2-Rezeptor-Agonisten neuroprotektiv ist, wurde gezeigt, dass Apomorphin (Grünblatt et al., 1999a), Bromocriptine (Takashima et al., 1999), Pergolid (Asanuma et al., 1995) und Pramipexol (Vu et al., 2000) die 6-OHDA-, MPTP- oder L-DOPA induzierte Neurotoxizität *in vitro* als auch *in vivo* verringern können. Hierbei wurde vermutet, dass Pergolid und Bromocriptine durch eine Verminderung der DA-Freisetzung über Aktivierung der präsynptischen D2-Autorezeptoren protektiv wirken (Asanuma et al., 1995; Takashima et al., 1999), in dem die TH Aktivität inhibiert wird (O'Hara et al., 1996). Die neuroprotektive Wirkung von Apomorphin gegenüber der 6-OHDA und MPTP-Toxizität wird dagegen eher seinen antioxidativen Eigenschaften und seiner Wirkung als Radikalfänger zugeschrieben (Gassen et al., 1998; Grünblatt et al., 1999a; Grünblatt et al., 1999b). Offensichtlich scheint der hier gezeigte Verlust des DAergen Phänotypus nach chronischer DA-Substitution eine gewisse Protektion vor der 6-OHDA-induzierten Degeneration zu gewährleisten. Allerdings stellt sich die Frage, ob der Funktionsverlust eine tatsächliche Neuroprotektion darstellt, gemäss der Hypothese, dass eine Hemmung der DA-Synthese und Freisetzung als neuroprotektive Therapiestrategie einzusetzen ist (Olanow et al., 1998), oder ob die derart unfunktionellen Neurone nicht auch zu einem späteren Zeitpunkt zugrunde gehen oder aus dem Neuronenverband entfernt werden.

Einfluss von Cabergolin auf die ‚extranigrale‘ Pathologie

Die Untersuchung zur Wirkung der chronischen DA-Substitution auf die 6-OHDA-induziert iTF Expression zeigt deutlich, dass insbesondere die kontinuierliche Stimulation von DA D2-Rezeptoren mit Cabergolin ‚normalisierend‘ auf die neuronale Aktivität in verschiedenen Kerngebieten einwirkt. Dies soll in Hinblick auf eine Wiederherstellung der Transmitterbalancen und damit eine mögliche Reduktion der ‚extranigralen‘ Pathologie diskutiert werden.

Motorische Basalganglien Kerne und PPTg

Eine ausgeprägte Wirkung auf die 6-OHDA-bedingte Induktion von c-Fos hat Cabergolin im MGP. Diese Beobachtung erscheint im Hinblick auf die GLU-getriebene Überaktivität dieses Kernes nach DA-Denervation besonders interessant. Die 6-OHDA-Läsion induziert eine anhaltende Expression von c-Fos, was in Einklang mit vorangegangenen Arbeiten steht, die eine erhöhte metabolische Aktivität und auch c-Fos Expression nach DA-Denervation im

MGP zeigten (Mitchell et al., 1989; Palombo et al., 1990; Hebb und Robertson, 1999; Nakao et al., 1998; Schuller und Marshall, 2000; Vila et al., 1996), die aller tierexperimentellen Befunde nach durch eine überaktive subthalamopallidale GLUerge Projektion angetrieben wird (Zusammenfassung in Blandini et al., 2000a). Vergleichbare Daten einer chronischen Behandlung mit L-DOPA zeigten, dass die erhöhte metabolische Aktivität des MGP nach MPTP-Behandlung durch die DA-Substitution normalisiert wird (Vila et al., 1996). Ebenso konnten intrastriatale mesencephale Transplantate, die eine kontinuierliche DA-Freisetzung in das Striatum gewährleisten, die 6-OHDA-induzierte erhöhte metabolische Aktivität normalisieren und die Apomorphin-induzierte akute c-Fos Expression im MGP inhibieren (Nakao et al., 1998), sowie die 6-OHDA-induzierte Zunahme der GAD76 sowie Präprosomatostatin mRNA im MGP normalisieren (Rajakumar et al., 1997). Zusammen mit den vorliegenden Befunden deutet dies darauf hin, dass eine kontinuierliche DA-Rezeptorstimulation, die Denervations-bedingte Überaktivität des MGP vermindert oder sogar normalisiert. Da die Neurone des MGP selbst nur über eine geringe DAerge Innervation verfügen, und nur D1- und keine D2-Rezeptoren exprimieren (Weiner et al., 1991; Yung et al., 1995) ist es unwahrscheinlich, dass die DA-Agonisten direkt im MGP auf dessen Aktivität wirken. Dies spricht vielmehr dafür, dass die Denervations-bedingte GLUerge Überaktivität des STN über die Inhibition der striatopallidalen Projektion normalisiert wird. In diesem Zusammenhang lassen sich auch die Effekte der Behandlung mit Cabergolin und Lisurid auf die 6-OHDA-induzierte Expression von c-Jun im PPTg diskutieren. Erhöhte metabolische und neuronale Aktivitäten des PPTg infolge von DA-Denervation konnten wiederholt gezeigt werden (Carlson et al., 1999; Mitchell et al., 1989; Nakao et al., 1998; Orioux et al., 2000; Palombo et al., 1990) und werden auf eine GLUerge Überstimulation durch den STN zurückgeführt (siehe 4.5.). Ähnlich wie im MGP können auch im PPTg intrastriatale mesencephale Transplantate die Apomorphin-induzierte Expression von c-Fos inhibieren (Nakao et al., 1998), was ebenfalls für eine Normalisierung der Transmitterbalance im PPTg spricht, und damit die hier erhobenen Befunde unterstützt. Die Abnahme der Läsions-bedingten Überaktivitäten des STN und des PPTg nach chronischer Behandlung mit den beiden DA-Agonisten mag auch die Ursache für die Reduktion der c-Fos und c-Jun Expression in der SNC sein. Unter der Annahme, dass die GLUerge Überstimulation aus STN und PPTg zur chronischen Degeneration beiträgt (siehe 4.5.), und eine anhaltende Expression dieser beiden iTFs Teil dieses Prozess sind, lassen die hier erhobenen Daten den Schluss zu, dass die eine Normalisierung der subthalamo- und pedunculopontinonigralen GLUergen Projektion eine Inhibition der chronischen iTF Aktivierung bewirkt und somit die langsame Neurodegeneration in der SNC möglicherweise aufhält. Diese Vermutung wird durch zwei tierexperimentelle Studien gestützt, die zeigten, dass eine vorangehende Exzitotoxinläsionen des STN bzw. des PPTg die Neurone der SNC vor der anschließenden 6-OHDA-Läsion bzw. MPTP Behandlung schützt und Verhaltensdefizite, die mit der Degeneration des nigrostriatalen DA-Systems verbunden sind, verhindert werden (Piallat et al., 1996; Takada et al., 2000).

Die hier beobachtete Reduktion der c-Fos und c-Jun Aktivierung im LGP nach chronischer Behandlung mit Cabergolin lässt sich weniger einfach durch eine Wiederherstellung der Transmitterbalancen im CPU und den damit verbundenen Projektionen erklären. Der LGP erhält selbst eine moderate DAerge Innervation durch nigrostriatale Kollateralen (Björklund

und Lindvall, 1984; Cossette et al., 1999; Hedreen, 1999), so dass die Aktivität der LGP Neurone über DA D1- und D2-Rezeptoren, die sie in geringer bis mittlerer Dichte exprimieren (Weiner et al., 1991; Yung et al., 1995), direkt durch die DAergen Neurone der SNC beeinflusst wird. Nach dem derzeitigen Modell der funktionellen Basalganglien Anatomie befindet sich der LGP nach DA-Denervation in einem hypoaktiven Zustand. Metabolische und biochemische Untersuchungen zeigten jedoch keine Veränderungen der Aktivität des MGP nach MPTP- oder 6-OHDA-Läsion (aktuelle Zusammenfassung in (Hirsch et al., 2000)). Die vorliegenden Daten zeigen ebenfalls, dass die DA-Denervation selbst keine Veränderung der c-Fos oder c-Jun Aktivität im LGP hervorruft, ebensowenig wie es eine akute 6-OHDA Infusion in das MFB konnte (Schuller und Marshall, 2000). Nach DA-Denervation steht der LGP unter der dualen Kontrolle einer vermehrten striatopallidalen GABAergen Inhibition und einer verstärkten reziproken subthalamopallidalen GLUergen Projektion (Kita und Kitai, 1987; Sato et al., 2000), was die ausbleibende Nettoveränderung der LGP Aktivität hinreichend erklären würde. Eine Stimulation ‚supersensitiver‘ striataler DA D2-Rezeptoren nach DA-Denervation würde nach dem derzeitigen Modell der Basalganglien Anatomie eine Disinhibition des LGP zu Folge haben. Funktionelle Untersuchungen bestätigen dies. So konnten D1- und D2-Rezeptor-Agonisten nach unilateraler nigrostriataler Läsion c-Fos im LGP induzieren (Ruskin und Marshall, 1997). Nach unilateraler 6-OHDA-induzierte eine akute DAerge Stimulation mit Amphetamin die c-Fos Expression im kontralateralen LGP (Hebb und Robertson, 1999; Wirtshafter und Asin, 1999), wohingegen Apomorphin c-Fos im ipsilateralen LGP induzierte (Hebb und Robertson, 1999; Nakao et al., 1998), was wiederum durch die intrastriatale Transplantation mesencephalen Gewebes inhibiert wurde (Nakao et al., 1998). Dieser Effekt wurde darüber erklärt, dass die kontinuierliche DA-Freisetzung durch das Transplantat die striatale DA D2-Rezeptor Supersensitivität reduzierte, und somit die Apomorphin-induzierte Disinhibition des LGP verringert. Vorliegende Befunde zeigen jedoch, dass die neuronale Aktivität des LGP nach chronischer DA D2-Stimulation stark reduziert wird, was sich nicht mit einer chronischen Disinhibition der striatopallidalen Projektion erklären lässt. Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung einer verminderten basalen Expression von c-Fos wäre eine direkte inhibierende Wirkung von Cabergolin auf LGP Neurone vermittelte über DA D2-Rezeptor. Hierdurch würde die postulierte duale Kontrolle des LGP nach DA-Denervation zugunsten einer verstärkten Inhibition verschoben werden. Die Vermutung, dass die nigropallidale DAerge Innervation und damit auch die DA-Rezeptor vermittelte Funktion der LGP Neurone eine bisher unterschätzte Rolle, sowohl in den gesunden, als auch in den parkinsonoiden Basalganglien spielt, wird derzeit durch wenige anatomische (Cossette et al., 1999) und funktionelle Befunde gestützt (Zusammenfassung in Smith und Kieval, 2000). So induzierte die lokale Infusion von DA D1- und D2-Antagonisten in den LGP Akinese (Hauber und Lutz, 1999). Eine Zunahme der Feuerrate von LGP Neuronen konnte nach Apomorphin Behandlung von Parkinson Patienten gezeigt werden, die wiederum mit einer Abnahme der MGP Feuerrate und dem Auftreten von Dykinesien korreliert war (Lozano et al., 2000). Dieser Effekt kann durch eine direkte Wirkung des DA-Agonisten im LGP erklärt werden, und würde dessen dyskinetisches Potential unterstreichen. *Vice versa* kann die hier beobachtete anhaltende Verminderung der c-Fos Expression und damit der neuronalen Aktivität nach chronischer Begandlung mit

Cabergolin prädiktiv für das antidyskinetische Potential dieses DA D2-Agonisten sein, insbesondere über dessen Wirkung auf die Projektionsneurone des LGP.

„Extended Amygdala“

Allgemein sind auch in den Basalganglien assoziierten Strukturen des EA Komplex die neuronalen Aktivitäten, gemessen an der Expression von c-Fos und c-Jun, nach chronischer DA D2-Rezeptorstimulation vermindert. Im Gegensatz zu den iTF Expressionsmustern die 8 Wochen nach intrastriataler 6-OHDA-Läsion gemessen wurden (siehe 4.5.), zeigt sich 4 Wochen nach der Läsion keine Nettoinduktion gegenüber den Kontrolltieren. So entspricht die hier gezeigte Abnahme der iTF Expression im BSTL und dem Me eher einer Inhibition der normalen physiologischen Aktivität. Eine neuroanatomische Studie zeigte eine hohe Dichte von [¹²⁵I]Iodosulpirid Bindungsstellen in den Kernen der EA, was sowohl für die Präsenz von prä- als auch postsynaptischen DA D2-Rezeptoren spricht (Scibilia et al., 1992). Die mesencephale DAerge Innervation ist ausgeprägt im BSTL, weniger im Me (Björklund und Lindvall, 1984). Dies impliziert eine regional unterschiedliche Regulation der EA Funktionen durch das DA-System. Die naheliegenste Erklärung für hier beobachtete Verminderung der ‚basalen‘ iTF Expressionen nach der Behandlung mit DA-Agonisten, wäre eine Verminderung der mesencephalen DA-Freisetzung über axonale DA D2-Rezeptoren, die den DAergen Antrieb in diesen Kernen reduzieren, und somit deren Aktivitätszustand vermindern. Ob dieser inhibierende Eingriff in die neuronale Aktivität der EA Kerne auch die zuvor beschriebene 8 Wochen anhaltende c-Fos Induktion (siehe 4.5.) reduzieren kann, und die auf dieser Beobachtung postulierten Transmittergleichgewichte wiederherstellen kann, lässt sich anhand der hier erhobenen Daten nur schwer zeigen, auch wenn eine Einflussnahme der DAergen Transmission auf die Aktivitäten dieser Kerne nachgewiesen wurde.

Zusammenfassung

Zusammenfassend ergibt sich, dass eine chronische kontinuierliche Stimulation von DA D2-Rezeptoren mit Cabergolin, im Gegensatz zu einer chronischen pulsatilen Stimulation mit Lisurid, ein geringes Risiko birgt, Verhaltenssensitivierungen im DA-denervierten Tier zu induzieren. Gleichzeitig kann die kontinuierliche DA-Substitution zu einer Normalisierung der neuronalen Funktion im dorsalen und ventralen Striatum führen, was wiederum als zelluläre Grundlage für das antidyskinetische Wirkprofil von Cabergolin angesehen werden kann. Darüberhinaus unterstützt eine DA-Substitution mit Cabergoline kompensatorische Mechanismen der DAergen Transmission im denervierten Striatum und induziert DAerges axonales ‚sprouting‘ im Acb. Beide Prozesse können auch bei der chronischen Behandlung von Parkinson Patienten zu einer Aufrechterhaltung der verbliebenen DAergen Transmission oder sogar zur partiellen Wiederherstellung der DAergen Innervation und damit zur Verminderung der Symptome führen. Keiner der beiden DA-Agonisten zeigt ein eindeutiges neuroprotektives Potential in der Form, dass DAerge Neurone vor der Degeneration geschützt werden und ihre Funktion in der mesotelencephalen DAergen Projektion erhalten bleibt. Hinsichtlich der ‚extranigralen‘ Pathologie, für die ursächlich veränderte Transmitterbalancen infolge der DA-Denervation postuliert werden, kann die kontinuierliche DA-Substitution mit Cabergolin zu einer Normalisierung der neuronalen Aktivitäten in den für die Parkinson-Krankheit relevanten Kernen der Basalganglien und

eng assoziierten Strukturen führen, und somit möglicherweise langfristig degenerative Prozesse inhibieren.

6. Wirkung eines NR2B-selektiven nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf die neurodegenerativen Effekte der 6-OHDA-Läsion

6.1. Einführung

Der gegenwärtige therapeutische Ansatz der Parkinson-Krankheit ist die symptomatische Therapie mit L-DOPA und direkten DA-Rezeptor-Agonisten, die eine Substitution des fehlenden Neurotransmitters DA gewährleisten. Die Wiederherstellung des DAergen Tonus nach der DA-Denervation, insbesondere an striatalen Projektionsneuronen ist zunächst ausreichend, die Effizienz DAerger Bahnen in den Kernen der Basalganglien zu normalisieren und dadurch eine Verbesserung der Symptome zu erreichen. Die Aufklärung der Pathophysiologie der Basalganglien bei der Parkinson-Krankheit verdeutlicht jedoch, dass neben dem progressiven Verlust der DAergen Innervation GLUerge Mechanismen entscheidend zur Symptomatik der Parkinson-Krankheit beitragen (Zusammenfassung in (Blandini et al., 2000a; Pedersen und Schmidt, 2000a; Schmidt und Kretschmer, 1997), gemäss dem ‚sekundären GLU-Überaktivitätssyndrom‘ (siehe 1.4.) (Starr et al., 1997). Die GLUerge Überaktivität ist zum einen auf Ebene des Striarums von grosser Bedeutung, wo die mesostriatale DAerge Innervation mit der kortikostriatalen GLUergen Projektion direkt an striatalen ‚medium spiny I‘ Projektionsneuronen interagiert (Zusammenfassung in Smith und Bolam, 1990) und somit deren neuronale Aktivität und Funktion entscheidend beeinflusst (Zusammenfassungen in Carlsson und Carlsson, 1990) (siehe 1.1.3). Zum anderen wird die Überaktivität der beiden Basalganglien Ausgangskerne SNR und MGP, die in Folge die thalamokortikale Unterfunktion und damit die Parkinson-Symptome bewirkt, durch die überaktive GLUerge Projektion des STN angetrieben. Zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass sowohl die systemische als auch die lokale Verabreichung von verschiedenen NMDA-Rezeptor-Antagonisten in die Basalganglien Ausgangskerne oder den STN die Parkinson-Symptome nach DA-Denervation oder funktioneller Blockade von DA-Rezeptoren aufheben (Kaur et al., 1997; Klockgether und Turski, 1990; Ozer et al., 1997, Zusammenfassungen in Blandini et al., 2000a; Schmidt et al., 1992; Schmidt und Kretschmer, 1997). Die selektive Läsion oder Inaktivierung des STN vermochte sowohl die MPTP-induzierten Parkinson-Symptome beim Affen zu vermindern (Aziz et al., 1991; Bergman et al., 1990), als auch die metabolische und funktionelle Überaktivität der SNR und des MGP nach unilateraler 6-OHDA-Läsion bei der Ratte zu inhibieren (Blandini et al., 1997; Burbaud et al., 1995). Hochfrequente Stimulation des STN durch lokale Elektroden wird derzeit bei wenigen Parkinson Patienten mit schweren motorischen Störungen und Dyskinesien erfolgreich eingesetzt (Pollak et al., 1997). Die anti-GLUerge Therapie mit den NMDA-Rezeptor-Antagonisten Amantadin, Memantin und Budipin zeigte auch bei Parkinson Patienten eine Verbesserung der Symptome (Danysz et al., 1997; Lange et al., 1997) und die Koadministration mit L-DOPA reduzierte die Schwere der LIDs, ohne den antiparkinsonoiden Effekt der L-DOPA Behandlung zu vermindern (Verhagen Metman et al., 1998) und wird daher als vielversprechende Strategie zur Vermeidung und Behandlung der LIDs diskutiert (Calon et al., 2000a; Chase und Oh, 2000a).

Neben der symptomatischen Behandlung verspricht die anti-GLUerge Therapie ein neuroprotektives Potential, unter dem Aspekt, dass die langsame ‚energie-gebundene Exzitotoxizität‘ zur Ätiopathogenese und Progression der SNC Degeneration beiträgt. So konnten einige Studien neuroprotektive Wirkungen von kompetitiven und nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf die MPTP/MPP⁺-induzierte nigrostriatale Degeneration beim Affen und im Nager zeigen (Brouillet und Beal, 1993; Lange et al., 1993; Santiago et al., 1992; Srivastava et al., 1993; Turski et al., 1991). Die GLU-Freisetzungshemmer Riluzol und Lamotrigine waren ebenfalls effektiv die MPTP- oder MPP⁺-induzierte striatale DA-Entleerung zu vermindern (Boireau et al., 1994a; Boireau et al., 1994b; Jones-Humble et al., 1994). Riluzol zeigte darüberhinaus im MPTP-behandelten Affen eine neuroprotektive Wirkung auf die SNC Neurone (Benazzouz et al., 1995), eine protektive Wirkung, die wahrscheinlich nicht nur auf die Inhibition der GLUergen Transmission zurückgeht, sondern auf eine Stabilisierung des Energiestoffwechsels und Reduktion des MPP⁺-induzierten oxidativen Stress (Storch et al., 2000). Interessanterweise können Exzitotoxinläsionen des STN aber auch die chronische Infusion von MK-801 die Neurone der SNC vor der 6-OHDA-Toxizität schützen (Blandini et al., 2000b; Piallat et al., 1996). Gleichfalls reduzierte eine vorangehende Läsion des PPTg mit Kainat die MPTP-induzierten Parkinson-Symptome im Affen und schützte darüberhinaus die SNC Neurone vor der Degeneration (Takada et al., 2000). *Vice versa* induzierte die Zunahme der STN Feuerrate nach Läsion des LGP eine Degeneration DAerger Neurone in der SNC (Atherton et al., 2000). Zusammen deuten diese Studien darauf hin, dass eine anti-GLUerge Therapie eine Verminderung der überaktiven GLUergen Projektionen aus dem STN und dem PPTg bewirken kann und somit bereits zu frühen klinischen Stadien der Parkinson-Krankheit die Progression des degenerativen Prozess aufhalten kann (Zusammenfassung in Blandini et al., 2000a; Pedersen und Schmidt, 2000a).

Bislang war es nicht möglich GLU-Rezeptor-Antagonisten, die im Tierversuch sowohl symptomatische als auch neuroprotektive Wirkung zeigten, in der Parkinson Therapie einzusetzen, mit Ausnahme der erwähnten NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin und Amantadin, die grundsätzlich eine eher geringe Affinität zum offenen Ionenkanal des NMDA-Rezeptors besitzen (Danysz et al., 1997). Dies ist hauptsächlich auf die psychotomimetischen Nebenwirkung der systemisch verabreichten Substanzen, insbesondere der nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten, zurückzuführen (Schmidt, 1994). Darüberhinaus besitzen NMDA-Rezeptor-Antagonisten selbst ein neurotoxisches Potential. Es wurde mehrfach gezeigt, dass MK-801, Phencyclidin, Ketamin und CPP pathomorphologische Veränderungen und Neurodegeneration in kortikalen und subkortikalen Regionen des adulten und juvenilen Gehirn der Ratte und des Primaten auslösen können (Fix et al., 1993; Ikonomidou et al., 1999; Ikonomidou et al., 2000; Olney et al., 1989; Olney et al., 1991; Sharp et al., 1994), was den langfristigen klinischen Einsatz dieser Substanzen nicht rechtfertigt. Die derzeit neu entwickelten NMDA-Rezeptor-Antagonisten, die selektiv für die Polyaminbindungsstelle der NR2B-SU des Rezeptors sind (Grimwood et al., 2000), versprechen verbesserte klinische Sicherheit und auch Effizienz, ohne über das psychotomimetische und neurotoxische Nebenwirkungsprofil der kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten zu verfügen (Zusammenfassung in Scatton, 1994). Der Wirkmechanismus dieser NR2B-selektiven Antagonisten, über eine allosterische ‚aktivitäts-

abhängige‘ Blockade des Rezeptors (Kew und Kemp, 1998; Legendre und Westbrook, 1991), gewährleistet eine Inhibition der überaktiven GLUergen Transmission, während die normale physiologische GLUerge Transmission unbeeinflusst bleibt. Für den Antagonisten CP-101,606 wurde *in vitro* gezeigt, dass er nur unter extrazellulären Bedingungen, in denen der pH erniedrigt ist, als potenter Inhibitor des NMDA-Rezeptors wirkt, während er bei physiologischer Ionenstärke inaktiv ist (Mott et al., 1998). Diese spezifische Charakteristik stellt ein vorteilhaftes Wirkprofil dar im Hinblick auf die postulierte langsame ‚energiegebundene Exzitotoxizität‘ bei der Parkinson-Krankheit, in der eine Azidifizierung des Gewebes als Folge der Energieentleerung impliziert wird (1.5.1.) (Zusammenfassung in Pedersen und Schmidt, 2000a).

In diesem Teil der Arbeit soll unter der Hypothese, dass eine partielle striatonigrale Degeneration eine sekundäre GLUerge Überaktivität in den Kernen der Basalganglien bewirkt und diese sowohl an der Ausprägung der Verhaltensdefizite als auch zur Entwicklung der ‚nigralen‘ und ‚extranigralen‘ Pathologie beiträgt, die dosisabhängige Wirkung einer chronischen Behandlung mit dem NR2B-selektive NMDA-Rezeptor-Antagonisten CP-101,609 untersucht werden. In Verhaltensexperimenten und *post mortem* Analysen sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Kann die chronische Behandlung mit CP-101,606 über 3 Wochen die Verhaltensdefizite, die durch eine partielle bilaterale striatonigrale 6-OHDA-Läsion ausgelöst werden, vermindern oder sogar aufheben?
2. Hat eine chronische systemische NR2B-selektive NMDA-Rezeptor Blockade zu einem frühen Zeitpunkt (Beginn: 8 Tage nach der Läsion) der retrograden striatonigralen Degeneration protektive Effekte auf die Neurone der SNC sowie auf die catecholaminerge Innervation des Vorderhirns?
3. Die Beobachtung, dass die partielle striatonigrale Läsion langfristig eine Zunahme der CB-exprimierenden Neurone im ventralen Mesencephalon bewirkt kann als kompensatorische zelluläre Reaktion dieser Neurone auf eine permanente GLUerge Überstimulation interpretiert werden (4.5.). Welche Wirkung hat daher die selektive Inhibition der GLUergen Überaktivität mit CP-101,606 auf die Expression von CB im ventralen Mesencephalon?
4. Die retrograde striatonigrale 6-OHDA-Läsion induziert einen verzögerten apoptotischen Zelltod in Neuronen der SNC, nachgewiesen an DNA-Fragmentation und pathomorphologischen Veränderungen, dem ein Verlust der TH IR vorangeht (Marti et al., 2000). Weiterhin konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass der 6-OHDA-induzierte apoptotische Zelltod die initiale Aktivierung von Caspase-3 (siehe 1.5.3.) erfordert (Cutillas et al., 1999; Dodel et al., 1999) und dass die Inhibition der Protease Aktivität von Caspase-3 die SNC Neurone vor der retrograden Degeneration nach intrastriataler 6-OHDA Injektion schützt (Cutillas et al., 1999). Eine aktuelle *post mortem* Untersuchung humaner Gehirne wies mehr pigmentierte Neurone in der SNC von Parkinson Patienten mit aktivierter Caspase-3 nach (Hartmann et al., 2000). Ebenso induzierte die subchronischen MPTP-Intoxikation von Mäusen eine Zunahme des aktiven p20 Fragments der Caspase-3. Weiterhin wurde durch ultrastrukturelle Untersuchungen gezeigt, dass die Aktivierung von Caspase-3 dem apoptotischen Zelltod vorangeht und nicht dessen Konsequenz ist (Hartmann et al., 2000). Aufgrund dieser

Befunde soll hier untersucht werden, ob die Aktivierung von Caspase-3 in DAergen Neuronen der SNC während der retrograden striatonigralen Degeneration abhängig ist, von der postulierten GLUergen Überaktivität und ob dies durch die selektive NR2B-Blockade mit CP-101,606 beeinflusst wird.

5. Die neuronale Aktivität und Funktion striataler Projektionsneurone wird im intakten Tier sowohl durch die DAerge als auch durch GLUerge Transmission reguliert (siehe auch 4.1.). Es wurde gezeigt, dass die striatale Expression von iTFs nach Stimulation von DA D1-Rezeptoren durch die NR2B-selektive Blockade des NMDA-Rezeptors mit Ifenprodil regionspezifisch potenziert wird, im Gegensatz zur Wirkung von kompetitiven Antagonisten oder MK-801, was deutlich macht, dass die verschiedenen NMDA-Rezeptor Subtypen die striatale Funktion unterschiedlich regulieren (Keefe und Ganguly, 1998). Daraus ergibt sich die Frage, welchen Einfluss die chronische NR2B-vermittelte Blockade der GLUergen Transmission auf die regionspezifische Expression der iTFs c-Fos, FosB und c-Jun im DA-denervierten Tier hat, und ob diese Behandlung zu einer Wiederherstellung der Transmitterbalance im dorsalen und auch ventralen Striatum führen kann. Gemäss dem Postulat, dass eine GLUerge Überaktivität auch in distalen Regionen zur ‚extranigralen‘ Pathologie nach DA-Denervation beiträgt, die sich zunächst in einer veränderten neuronalen Aktivität äussert, soll untersucht werden welche Effekte die chronische Behandlung mit CP-101,606 auf die 6-OHDA-induzierte Expression der iTFs in den Kernen der dorsalen und ventralen Basalganglien Schleifen sowie den eng assoziierten limbischen Strukturen hat.

6.2. Versuchsdurchführung

Für den Versuch zur Wirkung einer Langzeitbehandlung mit dem selektiven NR2B-SU NMDA-Rezeptor-Antagonisten CP-101,606 auf die neurodegenerativen Effekte der intrastriatalen 6—OHDA Läsion wurden 80 adulte, männliche Sprague-Dawley Ratten operiert. Nach angebenem Operationsverfahren (siehe 3.2) wurden pro Striatum 22 µg/2µl 6-OHDA (N=44), verteilt auf zwei Injektionsorte an folgenden Injektionskoordinaten infundiert: AP: 0.5/-0.4 mm, lateral: ±2.8/±3.4 mm, dorsoventral: -5.0/-4.8 mm. Kontrolltieren (N=29) wurde das entsprechende Volumen (2 x 1 µl/Striatum) 0.1 % Ascorbat, 0.9% NaCl infundiert. Am Tag 8 nach der Läsion wurden den Tieren substanzgefüllte, minisomotischen Pumpen implantiert (3.3) um einen kontinuierlichen Plasmaspiegel von 60 ng/ml (OHDA-60 CP: N=14) bzw. 200 ng/ml (Kontrolle-200 CP: N=14; OHDA-200 CP: N=15) über 24 h zu erreichen. Entsprechend wurden vehikelgefüllte (50 % DMSO in *a.a.i.*) Pumpen zur Substanzkontrolle implantiert (Kontrolle-DMSO: N=15; OHDA-DMSO: N=15). Um einen initialen Plasmaspiegel zu erreichen wurde den Tieren vor der Pumpenimplantation 2.23. mg/kg (OHDA-60 CP) bzw. 7.35 mg/kg (Kontrolle-200 CP, OHDA-200 CP) oder das entsprechende Volumen einer 3.6 % DMSO Lösung (Kontrolle-DMSO, OHDA-DMSO) i.p. injiziert. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Läsion und Pumpenimplantation auf spontane (Läsions-bedingte) bzw. substanzbedingte Verhaltensveränderungen getestet (siehe 3.5.). Mit Hilfe der miniosmotischen Pumpen erfolgte die Substanzapplikation über 21 Tage, wonach die Gehirne (Tag 29 nach Läsion) für neurochemische (siehe 3.6.1) und histologische (siehe 3.8.1)

Untersuchungen entnommen und präpariert wurden. Der Zeitplan für die Versuchsdurchführung ist in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Zeitplan der Versuchsdurchführung

Tag	Behandlung/Versuch
-1	Prätest Katalepsie
0	Operation
8	Spontanverhalten: Katalepsie, Lokomotion, Exploration
9	Pumpenimplantation, Beginn der Behandlung mit CP-101,606
22	Verhalten: Katalepsie, Lokomotion, Exploration
29	Ende der Behandlung mit CP-101,606 Verhalten: Katalepsie, Lokomotion, Exploration Dekapitierung, Perfusion

6.3 Ergebnisse

Von 45 Tieren die eine bilaterale 6-OHDA-Läsion erhalten hatten, musste ein Tier auf Grund postoperativer Komplikationen eingeschlafert werden (entspricht 2 % Läsions-bedingtem Ausfall), die narkosebedingte Ausfallrate lag behandlungsunabhängig bei 9 % (7/80). Die Überwachung der Körpergewichte vor und während der Behandlung ergab keine Unterschiede in der Gewichtszunahme (Abb. 40) zwischen den Behandlungsgruppen über den Beobachtungszeitraum [2-ANOVA für Interaktion: $F_{12,295}=0.5$, $p=0.91$], alle Behandlungsgruppen zeigten eine normale Gewichtszunahme über die beobachtete Zeit [2-ANOVA für Faktor ZEIT: $F_{3,222}=68.2$, $p<0.0001$]. Weder die akute noch die chronische Applikation von CP-101,606 löste Verhaltensauffälligkeiten in den Haltungskäfigen aus.

6.3.1. Spontanverhalten

Katalepsietest

Die Tiere wurden vor der intrastriatalen 6-OHDA-Läsion auf spontane Katalepsie getestet, anhand dessen sie auf die verschiedenen Behandlungsgruppen gematcht wurden. Die 6-OHDA-Läsion verursachte eine Zunahme der Abstiegslatenzen 8 Tage nach Läsion [Kruskal-Wallis ANOVA: Gitter: $\chi^2=32.1$, $p<0.001$; Stange: $\chi^2=25.3$, $p<0.0001$], so dass die Tiere vor dem Beginn der Behandlung eine deutliche, spontane Katalepsie zeigten. Im Verlaufe des Untersuchungszeitraumes nahm die Katalepsie, besonders an der Stange, nach 6-OHDA-Läsion kontinuierlich zu (Abb. 41), unbeeinflusst von der chronischen Behandlung mit CP-101,606 [Friedman-ANOVA: OHDA-DMSO: Gitter: $\chi^2=25.0$, $p<0.0001$; Stange: $\chi^2=32.8$, $p<0.0001$; OHDA-60 CP: Gitter: $\chi^2=26.4$, $p<0.001$; Stange: $\chi^2=31.5$, $p<0.0001$; OHDA-200 CP: Gitter: $\chi^2=28.5$, $p<0.001$; Stange: $\chi^2=28.7$, $p<0.0001$]. Keine der beiden Konzentrationen der CP-101,606 Behandlung zeigte hierbei einen antikataleptischen Effekt; für beide Zeitpunkte nach Pumpenimplantation waren die Abstiegslatenzen aller lädierten Tiere erhöht [Kruskal-Wallis ANOVA: Tag 22: Gitter: $\chi^2=22.3$, $p=0.0002$; Stange: $\chi^2=34.6$, $p<0.0001$; Tag 29: Gitter: $\chi^2=27.1$, $p<0.0001$; Stange: $\chi^2=31.1$, $p<0.0001$]. Der paarweise Vergleich ergab einen antikataleptischen Trend für 200 ng/ml CP-101,606 am Tag 22 an der Stange ($p=0.04$ vs. OHDA-DMSO) und für 60 mg/ml CP-101,606 am Tag 29 am Gitter ($p=0.06$ vs. OHDA-200 CP). Die chronische Behandlung der Kontrolltiere mit 200 ng/ml CP-101,606 hatte keinen prokataleptischen Effekt (Abb. 41).

Aktivitätsbox

Bezüglich der untersuchten Verhaltensparameter in der Aktivitätsbox induzierte die intrastriatale 6-OHDA-Läsion eine signifikante Abnahme der lokomotorischen Aktivität und der vertikalen explorativen Aktivität (Abb. 42).

Am Tag 8 nach Läsion war die Dauer der Immobilität nach 6-OHDA-Läsion erhöht [Kruskal-Wallis ANOVA: $\chi^2=12.6$, $p=0.01$], entsprechend nahm die Gesamtdauer der Vorwärtslokomotion ab [Kruskal-Wallis ANOVA: $\chi^2=9.7$, $p=0.05$]. Die Behandlung mit CP-101,606 nach 6-OHDA-Läsion hatte an den folgenden Testtagen keinen Effekt auf diese beiden Verhaltensparameter, obwohl die CP-behandelten Kontrolltiere sich gegenüber den Kontrolle-DMSO und OHDA-DMSO Gruppen im Mittel länger bewegten [Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.02$ bzw. $p=0.05$]. Wiederholtes Testen führte sowohl bei den DMSO behandelten Kontrolltieren als auch den 6-OHDA lädierten, DMSO-behandelten Tieren zu einer Abnahme der Lokomotion (Abb. 42 B) und damit Zunahme der Immobilität was durch eine signifikante Friedman-ANOVA bestätigt wurde [Kontrolle-DMSO: $\chi^2=19.0$, $p<0.0001$; OHDA-DMSO: $\chi^2=8.4$, $p=0.02$]. Die Tiere die mit CP-101,606, behandelt wurden, unabhängig von der 6-OHDA-Läsion zeigten diese Verhaltenshabituation nicht.

Die Anzahl des Aufrichtens an den Wänden und in der Ecken war sowohl BEHANDLUNGS- als auch ZEIT-abhängig nach 6-OHDA-Läsion reduziert [2-ANOVA für Faktor BEHANDLUNG: ‚rearing‘: $F_{4,73}=122.4$, $p<0.0001$, Faktor ZEIT: $F_{2,148}=174.4$, $p<0.0001$; Faktor BEHANDLUNG für ‚rearing‘ in den Ecken: $F_{4,73}=10.9$, $p<0.0001$, Faktor ZEIT: $F_{2,148}=19.7$, $p<0.0001$], mit einer wesentlichen Interaktion beider Faktoren für das gesamte ‚rearing‘ [$F_{8,221}=5.80$, $p<0.0001$]. Der paarweise *post-hoc* Vergleich ergab eine signifikante Reduktion der Exploration der 6-OHDA lädierten Tiere gegenüber den beiden Kontrollgruppen am Tag 8 und 22 nach Läsion (Abb. 42E,F), wobei die Behandlung mit CP-101,606 keinen weiteren Einfluss darauf hatte. Geringere, reduzierende Effekte hatte wiederholtes Testen auf die Anzahl der Drehungen um die Körperachse der DMSO-behandelten Kontrolltiere [2-ANOVA für Faktor ZEIT: $F_{2,150}=9.2$, $p=0.0002$] mit geringfügigem Einfluss der BEHANDLUNG [2-ANOVA für Interaktion: $F_{8,224}=2.0$, $p=0.06$], und ohne Effekte der 6-OHDA-Läsion oder der CP-101,606 Behandlung (Abb. 42D).

6.3.2. Neurochemie

Die Wirkungen der chronische Behandlung mit CP-101,606 auf den Gewebegehalt der biogenen Amine DA, NA und 5-HT sowie deren Metaboliten DOPAC, HVA und 5-HIAA im rostralen und kaudalen CPu, Acb und mPFC nach intrastriatale 6-OHDA-Läsion sind in (Abb. 43) dargestellt.

Im CPu verursachte die intrastriatale 6-OHDA-Läsion eine ausgeprägte DA-Entleerung (Abb. 43B) (rCPu: 53 – 67 % bzw. im cCPu: 21 – 36 % der Kontrolle-DMSO Tiere) was durch eine signifikante 1-ANOVA unterstützt wird [rCPu: $F_{4,39}=5.1$, $p=0.002$; cCPu: $F_{4,39}=27.9$, $p<0.0001$]. Der paarweise *post-hoc* Vergleich konnte keinen Einfluss der Behandlung mit CP-101,606 auf das Ausmass der Entleerung zeigen (Abb. 43B). Ebenso war der Gewebegehalt der Metaboliten DOPAC und HVA im rCPu (DOPAC: 61 – 69 % bzw. HVA: 60 – 65 % der Kontrolle-DMSO Tiere) und cCPu (DOPAC: 42 – 60 % bzw. HVA: 34 – 47 % der Kontrolle-DMSO Tiere) reduziert [1-ANOVA: rCPu: DOPAC: $F_{4,39}=2.9$, HVA: $F_{4,39}=3.9$, $p=0.01$; cCPu: DOPAC: $F_{4,39}=7.7$, $p=0.0001$, HVA: $F_{4,39}=10.9$, $p<0.0001$] ohne Wirkung der CP-Behandlung nach 6-OHDA-Läsion. Ein erhöhter DA-Umsatz [1-ANOVA: $F_{4,39}=4.8$, $p=0.004$], gemessen als

Verhältnis HVA/DA konnte im cCPU der OHDA-60 CP Tiere nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Die 6-OHDA-Läsion und die chronischen Behandlungen mit CP-101,606 blieben auf die Gewebegehalte der anderen Neurotransmitter und Metaboliten im CPU ohne Einfluss (Abb. 43A,B).

Im Acb reduzierte die intrastriatale 6-OHDA-Läsion den Gewebegehalt von DOPAC (64.9 ± 8.5 % der Kontrolle-DMSO) und HVA (61.3 ± 8.3 % der Kontrolle-DMSO) [1-ANOVA DOPAC: $F_{4,38}=3.0$, $p=0.03$; HVA: $F_{4,38}=6.1$, $p=0.009$] im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 43C). Die Behandlung mit CP-101,606 hatte darauf keinen wesentlichen Effekt, wobei die chronische 60 ng/ml CP-Behandlung (Abb. 43C) den DA-Metabolismus (HVA/DA) im Acb im Vergleich zur Kontrolle-DMSO Gruppe verminderte [1-ANOVA: $F_{4,38}=3.1$, $p=0.03$]. Wie im CPU blieben das NAerge und serotonerge Transmittersystem unbeeinflusst.

Im Gegensatz dazu, waren im mPFC sowohl der Gewebegehalt von NA als auch von 5-HT durch die Behandlung signifikant verändert [1-ANOVA: NA: $F_{4,39}=3.7$, $p=0.01$, 5-HT: $F_{4,38}=3.0$, $p=0.03$], der angewandte *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich konnte jedoch keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zeigen (Abb. 43C) Aus der Abbildung geht jedoch hervor, dass die Gewebgehalte von NA und 5-HT, aber auch von DOPAC und DA [1-ANOVA: DOPAC: $F_{4,38}=2.7$, $p=0.05$; DA: $F_{4,38}=2.4$, $p=0.07$] nach 6-OHDA-Läsion im Vergleich zur Scheinläsion eher erhöht waren, nach chronischer CP-Behandlung dagegen erniedrigt, ohne dass jedoch weitere Effekt auf den Metabolismus des jeweiligen Transmitters nachgewiesen werden konnten (Abb. 43D).

6.3.3. Histologie

Veränderungen ventraler Mittelhirnneurone

Die Stereologie-basierte Abschätzung der absoluten Neuronenzahl im Mittelhirn zeigte eine, nach 30 Tagen signifikante retrograde Degeneration der SNC (Abb. 49B) ausgelöst durch die intrastriatale 6-OHDA Infusion. Sowohl die Anzahl der Nissl-gefärbten Neurone (Abb. 44C), als auch der TH-positiven Neurone (Abb. 44A) war in der SNC reduziert (Nissl: 67 - 74% bzw, TH: 65 - 86 % der Kontrolle-DMSO Gruppe), was durch eine signifikante nicht-parametrische Kruskal-Wallis ANOVA bestätigt wurde [Nissl: $\chi^2=12.4$, $p=0.02$, TH: $\chi^2=15.3$, $p=0.004$]. Der paarweise Vergleich konnte keine Effekte der CP-Behandlung zeigen (Abb. 44). Die Neuronenverluste umfassten rostrale, mediale und kaudale Anteile der SNC, entsprechend der Plazierung der Läsionen im dorsomedialen CPU. Im VTA konnte keine retrograde Degeneration, gemessen am Verlust TH-positiver bzw. Nissl-gefärbter Neurone, beobachtet werden (Abb. 44B,D).

Morphologisch zeigen die überlebenden Neurone der SNC Anzeichen zellulärer Atrophie oder eine deutlich Verminderung der zytoplasmatischen Nisslsubstanz (Abb. 48B); pathomorphologische Veränderungen, die auch nach der chronischen Behandlung mit CP-101,606 in qualitativ ähnlichem Ausmass beobachtet wurden.

Die stereologie-basierte Abschätzung der absoluten Anzahl CB-positiver Neurone ergab keine 6-OHDA-bedingten oder CP-101,606-induzierten Veränderungen (Abb. 44E,F).

Qualitativer Nachweis von Apoptose in der SNC

Zur Beurteilung, ob, und in welchem Ausmass, DAerge Neurone der SNC 30 Tage nach der intrastriatalen Injektion von 6-OHDA durch apoptotischer Zelltod degenerieren, wurden

Immunfluoreszendoppelfärbungen (siehe 3.8.4/5) von TH mit dem Nachweis von DNA-Fragmenten (TUNEL) bzw. mit aktivierter Caspase-3 durchgeführt. Die Auswertung mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning Mikroskops (siehe 3.9.4.) konnte einzelne Neurone in der SNC und auch dem VTA mit DNA-Fragmentation nach intrastriatler 6-OHDA Injektion zeigen. Die TUNEL-Färbung war hauptsächlich, aber nicht ausschliesslich nukleär lokalisiert (Abb. 52B,E), was auf eine Beschädigung der Kernmembran als Folge voranschreitenden Zelltodes hindeutet. Diese Veränderungen wurden nicht nach Injektion von 0.1 % Ascorbat beobachtet, jedoch in qualitative gleichem Ausmass in den Gehirnen der CP-behandelten Tiere mit 6-OHDA-Läsion. Gleichzeitiger Nachweis der TH IR konnte keine Kolokalisation des TUNEL-Färbung in TH-positiven Neuronen zeigen (Abb. 52C,F). Die Färbung des aktivierten p20 Fragment der Caspase-3 zeigte keine spezifische Färbung in der SNC der Kontrolltiere, die auch nicht mit TH IR kolokalisiert war, oder innerhalb TH-positiver Neurone zu finden war (Abb. 53A,J). Als Folge der 6-OHDA nahm die CM-1 IR in der SNC zu, kolokalisierte jedoch nicht mit TH, allerdings zeigten wenige TH-positive Neurone Vakuolisierungen in denen CM-1 IR sichtbar war (Abb. 53B,K) Diese pathomorphologischen Veränderungen einzelner TH-positiver Neurone waren ebenfalls nach der Behandlung mit CP-101,606 zu beobachten, darüberhinaus war die CM-1 IR gelegentlich mit TH IR in angeschnittenen Fortsätzen kolokalisiert (Abb. 53C,L).

Quantitative Veränderungen der c-Fos Expression

Die quantitative Abschätzung der numerischen Dichte c-Fos-positiver Neurone in verschiedenen Gehirnregion konnte wesentliche Effekte der chronischen Behandlung mit CP-101,606 auf die 6-OHDA-verbundene Expression von c-Fos zeigen (Abb. 45).

In allen rostro-kaudalen Abschnitten des mediodorsalen CPu konnte ein statistischer Trend eine reduzierte c-Fos IR 6-OHDA-Läsion im Vergleich zur Scheinläsion zeigen [Kruskal-Wallis ANOVA mCpuc: $\chi^2=8.7$, $p=0.07$, Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.07$]. Im Vergleich dazu war die c-Fos Expression im laterodorsalen CPu durch die Läsion unbeeinflusst, jedoch induzierte die chronische Behandlung mit CP-101,606 nach 6-OHDA-Läsion eine vermehrte c-Fos IR [Kruskal-Wallis ANOVA lCpum: $\chi^2=11.1$, $p=0.03$] (Abb. 45C,D). Im kaudalen Acb löste die chronische Behandlung mit 200 ng/ml CP eine signifikante Zunahme der c-Fos-IR verglichen mit der 6-OHDA-Läsion aus (Abb. 50B) [Kruskal-Wallis-ANOVA: $\chi^2=9.1$, $p=0.06$, Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.004$]. In der SNC wie im VTA war die c-Fos IR nach 6-OHDA-Läsion ebenso reduziert und wurde durch die Behandlung mit CP-101,606 in Richtung einer Zunahme beeinflusst (Abb. 50F) [Kruskal-Wallis-ANOVA SNC: $\chi^2=6.4$, $p=0.2$, Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.02$; VTA: $\chi^2=12.0$, $p=0.02$] (Abb. 45C,D). In der SNR führte die chronische Behandlung mit 200 ng/ml CP nach 6-OHDA-Läsion zu einer erhöhten c-Fos IR [Kruskal-Wallis-ANOVA: $\chi^2=6.8$, $p=0.2$, Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.03$] (Abb. 45). Die chronische Behandlung mit 200 ng/ml CP-101,606 nach 6-OHDA-Läsion bewirkte im BSTL eine Zunahme c-Fos-positiver Neurone (Abb. 50D) [Kruskal-Wallis-ANOVA: $\chi^2=6.8$, $p=0.1$, Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.04$] gegenüber den CP-behandelten Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu reduzierte 60 ng/ml CP-101,606 die Anzahl c-Fos-positiver Neurone im Ce im Vergleich zu Kontrolle und 6-OHDA-Läsion [Kruskal-Wallis-ANOVA: $\chi^2=8.4$, $p=0.08$, Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.03$ bzw. $p=0.04$]. In allen anderen untersuchten Kerngebieten hatte weder die intrastriatle 6-OHDA-Läsion noch die chronische Behandlung mit CP-101,606 Effekte auf die Expression von c-Fos (Abb. 45).

Quantitative Veränderungen der FosB Expression

Die quantitative Abschätzung der numerischen Dichte FosB-positiver Neurone zeigte hauptsächlich in den Eingangsstrukturen der dorsalen und ventralen Basalganglien Schleifen nach 6-OHDA-Läsion anhaltende Expression von FosB, mit geringen Effekten der chronischen Behandlung mit CP-101,606 (Abb. 46A,B).

Sowohl im dorsomedialen, als auch im dorsolateralen CPu führte die 6-OHDA-Läsion zu einer Zunahme FosB-positiver Neurone [Kruskal-Wallis-ANOVA: mCPum: $\chi^2=10.8$, $p=0.03$; mCPuc: $\chi^2=15.4$, $p=0.004$; lCPum: $\chi^2=9.0$, $p=0.06$; lCPuc: $\chi^2=8.1$, $p=0.09$], ohne Effekte der CP-Behandlung nach 6-OHDA-Läsion, wobei im mCpuc 200 ng/ml CP-101,606 bereits alleine zu einer Zunahme FosB-positiver Neurone führte (Abb. 46A) Im Acb reduzierte 200 ng/ml CP-101,606 die Läsions-assoziierte Expression von FosB (Abb. 51B) [Kruskal-Wallis-ANOVA: Acbcr: $\chi^2=8.2$, $p=0.08$; Acbshc: $\chi^2=7.7$, $p=0.1$; Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.009$ bzw. $p=0.05$]. Ebenso zeigte der paarweise Vergleich eine CP-bedingte Reduktion FosB-positiver Neurone im BSTM verglichen mit der Läsions-assoziierten FosB Expression [Kruskal-Wallis-ANOVA: $\chi^2=6.5$, $p=0.2$; Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.03$] und dem MS [Kruskal-Wallis-ANOVA: $\chi^2=7.0$, $p=0.1$; Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.04$ bzw. $p=0.02$] (Abb. 46). Keine wesentlichen Veränderungen der FosB Expression wurden in den anderen untersuchten Kerngebieten beobachtet (Abb. 46).

Quantitative Veränderungen der c-Jun Expression

Die 6-OHDA-Läsion und die chronische Behandlung mit CP-101,606 hatte regional sehr differentielle Veränderungen der Expression von c-Jun zur Folge (Abb. 47).

Im mediodorsalen CPu induzierte die Behandlung mit 200 ng/ml CP nach 6-OHDA-Läsion eine Zunahme der c-Jun-positiven Neurone (Abb. 51D) [Kruskal-Wallis ANOVA: mCPum: $\chi^2=10.3$, $p=0.04$; mCPuc: $\chi^2=8.5$, $p=0.08$] verglichen mit der DMSO- und CP-behandelten Kontrollgruppe (Abb. 47A). Im rostralen Anteil des Acbc reduzierte die 200 ng/ml CP-Behandlung die Expression von c-Jun nach 6-OHDA-Läsion [Kruskal-Wallis ANOVA: $\chi^2=5.1$, $p=0.3$; Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.02$], wohingegen im kaudalen Anteil des Acbc die chronische CP-Behandlung der Kontrolltiere eine verstärkte Expression von c-Jun zur Folge hatte [Kruskal-Wallis ANOVA: $\chi^2=9.1$, $p=0.06$] (Abb. 47B, Abb. 51F).

In den Kernen der dorsalen Basalganglien Schleife induzierte sowohl die chronische Behandlung mit CP-101,606 alleine [Kruskal-Wallis ANOVA: LGP: $\chi^2=8.1$, $p=0.09$; Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.03$], oder nach 6-OHDA-Läsion [Kruskal-Wallis ANOVA: MGP: $\chi^2=7.6$, $p=0.1$; Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.03$] eine vermehrte Expression von c-Jun. In der SNC und SNR wurde durch die 6-OHDA-Läsion eine Zunahme c-Jun-positiver Neurone ausgelöst [Kruskal-Wallis ANOVA: SNC: $\chi^2=18.1$, $p=0.001$; SNR: $\chi^2=9.4$, $p=0.05$], auf die die Behandlung mit CP-101,606 keinen weiteren Einfluss hatte (Abb. 47C). Eine ähnliche Beobachtung wurde im BSTM gemacht [Kruskal-Wallis ANOVA: $\chi^2=13.1$, $p=0.01$].

Die chronische Behandlung mit 200 ng/ml CP-101,606 nach 6-OHDA-Läsion hatte im VP, im VTA als auch im PPTg eine anhaltende Zunahme c-Jun-positiver Neurone zur Folge (Abb. 47) [Kruskal-Wallis ANOVA: VP: $\chi^2=14.4$, $p=0.0006$, VTA: $\chi^2=11.3$, $p=0.02$; PPTg: $\chi^2=5.7$, $p=0.2$, mit Mann-Whitney *U*-Test: $p=0.03$].

Weiterhin bewirkte allein die chronische Behandlung mit CP-101,606 eine Vermehrung der c-Jun IR im lateralen Septum [Kruskal-Wallis ANOVA: LS: $\chi^2=10.1$, $p=0.04$] (Abb. 47F).

Qualitative Veränderungen der c-Fos, FosB und c-Jun Expression

Der qualitative Vergleich der Expressionsmuster von c-Fos und c-Jun zeigte keine bis geringe Zunahmen in allo- und isocorticalen Regionen, sowie in ausgewählten Kernen des limbischen Vorderhirns (siehe Tabelle 12), die mit der 6-OHDA-Läsion assoziiert war. Vielmehr bewirkte die chronische Behandlung mit CP-101,606 nach der 6-OHDA-Läsion eine Zunahme der c-Fos IR, wie z.B. im Pir, M1/2, S1/2, dem LEnt sowie dem Nucleus basalis Meynert. Die Expression von c-Jun nahm qualitativ nach chronischer CP-Behandlung der Kontrolltiere zu (siehe Tabelle 12), wie im Nucleus basalis Meynert, Pir und der CA1 Region des Hippokampus, wohingegen c-Jun im Gyrus dentatus durch 200 ng/ml CP-Behandlung nach Läsion qualitativ verstärkt exprimiert war. Für die qualitative Expression von FosB konnten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen beobachtet werden (siehe Tabelle 12).

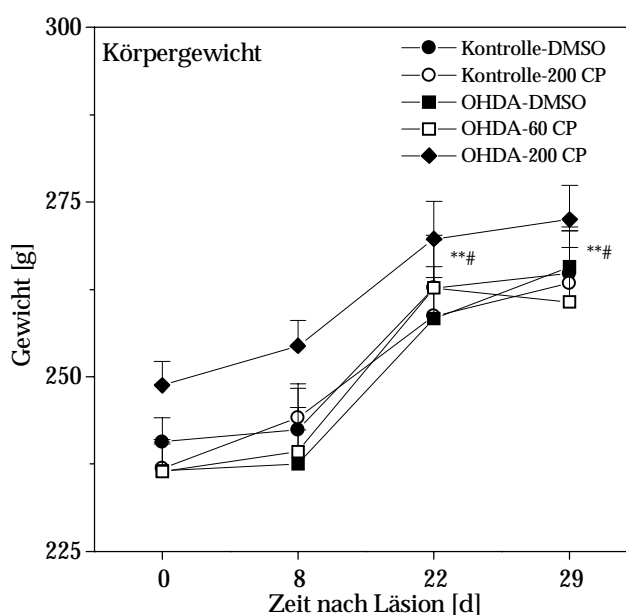


Abb. 40: Wirkung der Behandlung mit 60 ng/ml (N=14) und 200 ng/ml (N=15) CP-101,606 nach intrastriateller 6-OHDA-Läsion (N=15) auf die Gewichtszunahme, verglichen mit 50 % DMSO (N=14) bzw. mit 200 ng/ml CP-101,606 (N=15) behandelten Kontrolltieren über einen Zeitraum von 29 Tagen nach Läsion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; ** $p < 0.01$ vs. Tag 0; # $p < 0.05$ vs. Tag 8 für alle Behandlungsgruppen (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

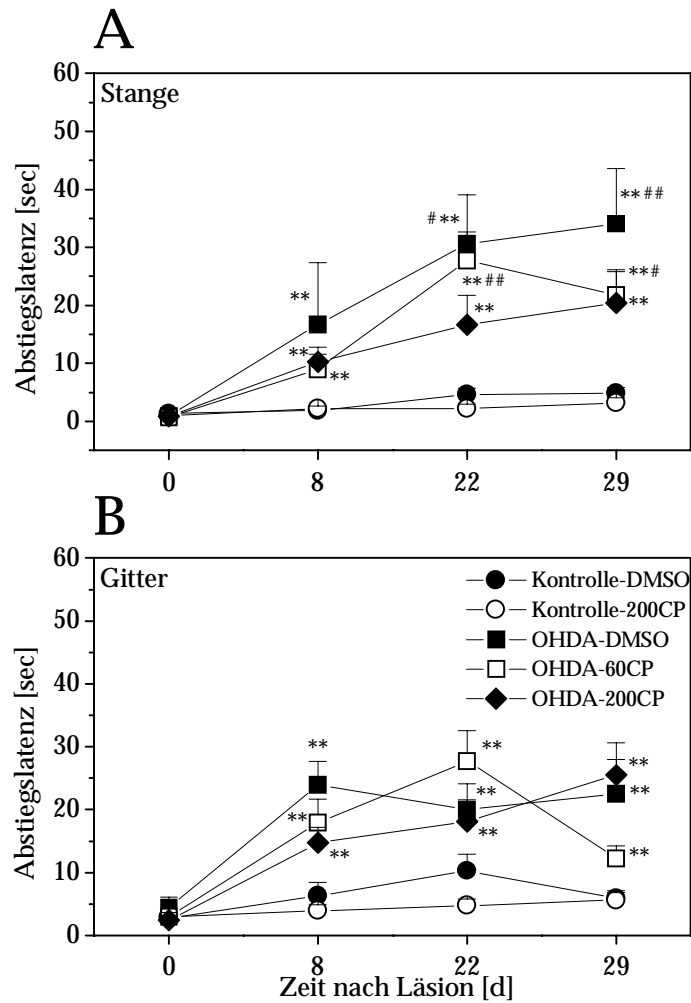


Abb. 41: Wirkung der Behandlung mit 60 ng/ml (N=14) und 200 ng/ml (N=15) CP-101,606 nach intrastriatärer 6-OHDA-Läsion (N=15) auf die Zunahme der Katalepsie [horizontale Stange (A), vertikales Gitter (B)], verglichen mit 50 % DMSO (N=14) bzw. mit 200 ng/ml CP-101,606 (N=15) behandelten Kontrolltieren über einen Zeitraum von 29 Tagen nach Läsion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; ** $p < 0.01$, vs. Tag 0, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Tag 8 (Wilcoxon-Signed Rang Test für paarweisen Vergleich bei wiederholter Messung).

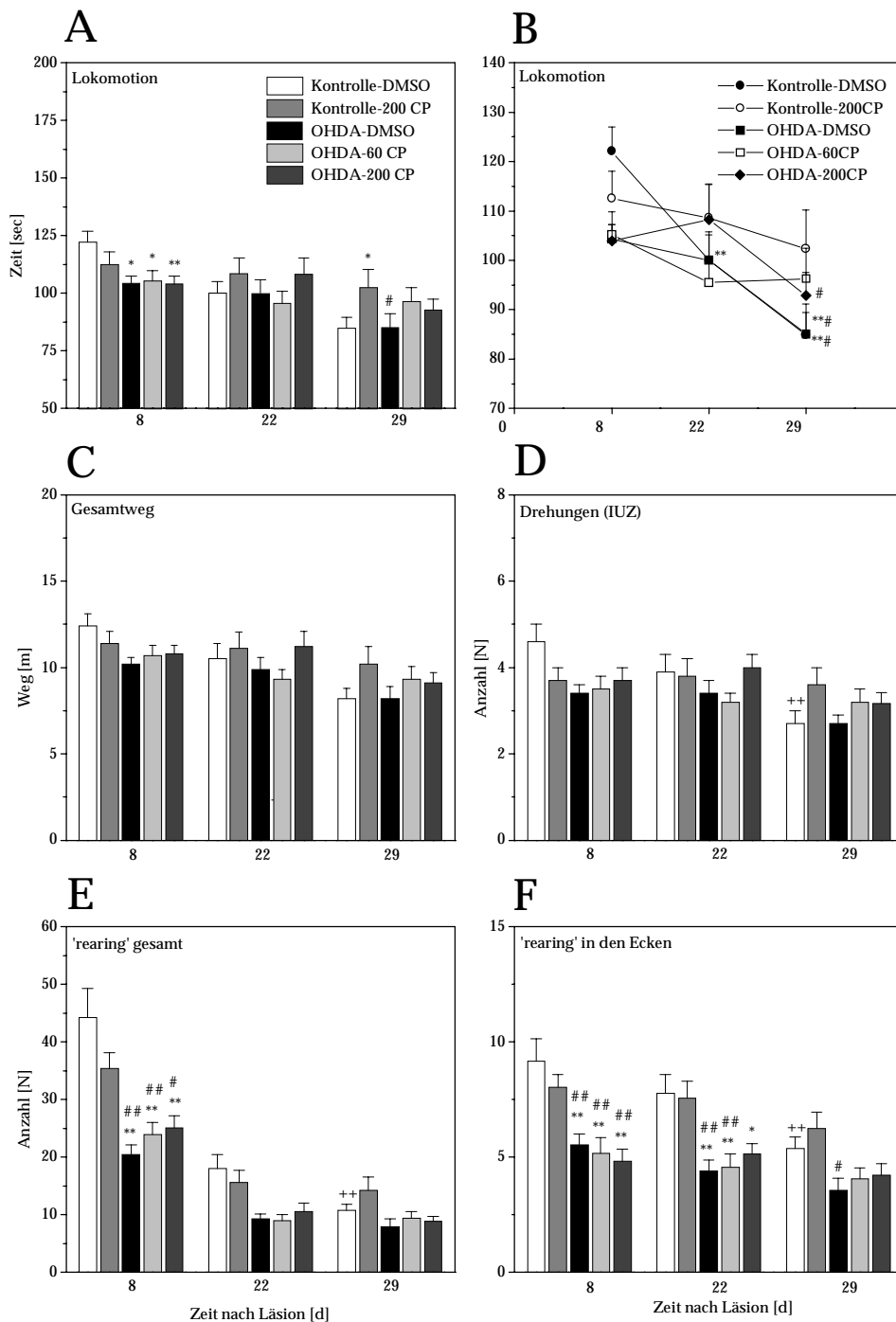


Abb. 42: Wirkung der Behandlung mit 60 ng/ml (N=14) und 200 ng/ml (N=15) CP-101,606 nach intrastratialer 6-OHDA-Läsion (N=15) auf die lokomotorische und explorative Aktivität [Dauer der Vorwärtslokomotion (A), Dauer der Vorwärtslokomotion bei wiederholtem Testen (B), zurückgelegte Wegstrecke (C), Anzahl der Drehungen um die Körperachse im Uhrzeigersinn (D), Anzahl des Aufrichtens an der Wand (E) und Anzahl des Aufrichtens in der Ecke (F)], verglichen mit 50 % DMSO (N=14) bzw. mit 200 ng/ml CP-101,606 (N=15) behandelten Kontrolltieren über einen Zeitraum von 29 Tagen nach Läsion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; (A): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle-DMSO; # $p < 0.05$ vs. Kontrolle-200 CP (Mann-Whitney *U*-Test für paarweisen Vergleich); (B): ** $p < 0.01$ vs. Tag 8, # $p < 0.05$ vs. Tag 22 (Wilcoxon Signed Rang Test für paarweisen Vergleich nach wiederholter Messung); (C-F): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. Kontrolle-DMSO; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Kontrolle-200 CP, ++ $p < 0.01$ vs. Tag 8 (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

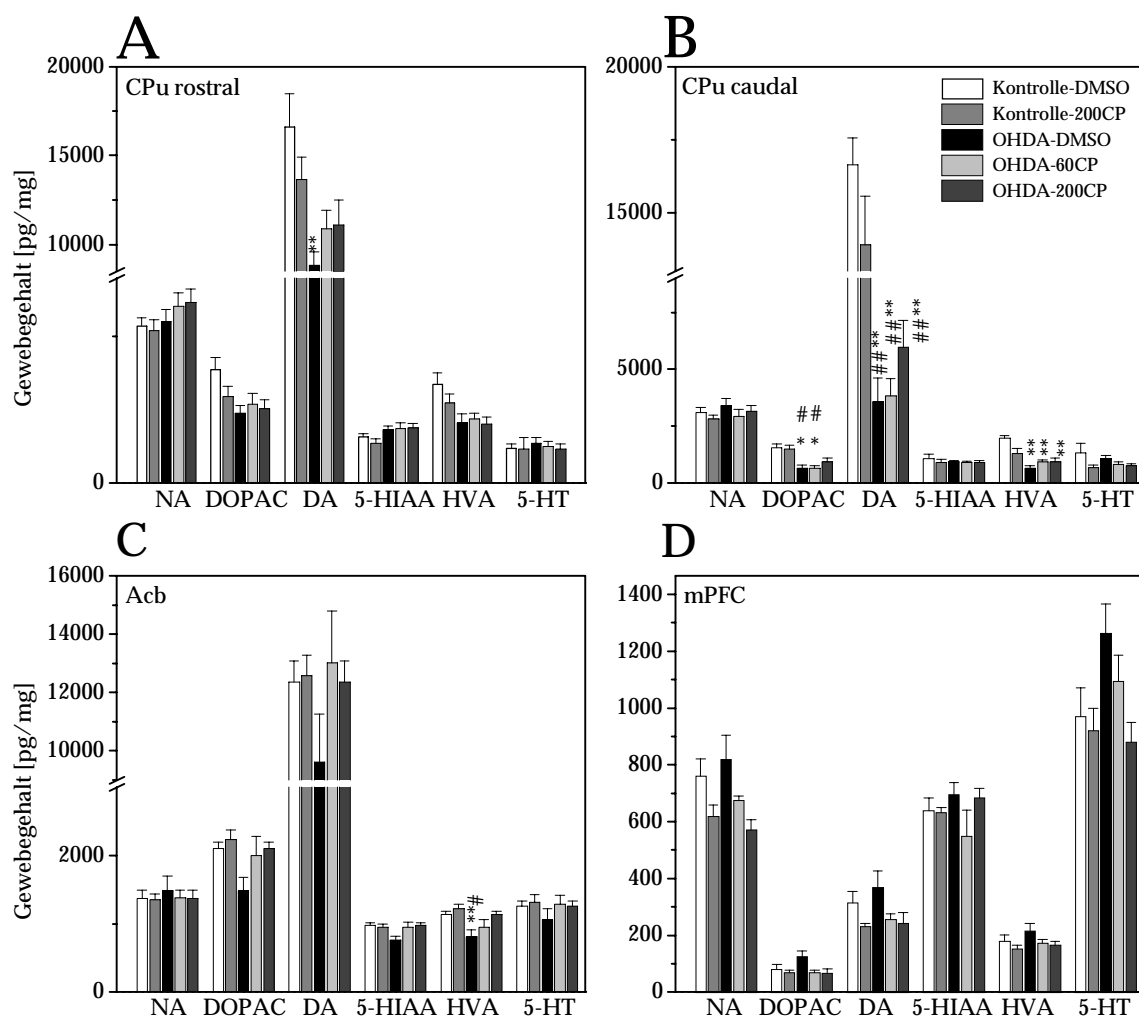


Abb. 43: Wirkung der chronischen Behandlung mit 60 ng/ml (N=8) und 200 ng/ml (N=8) CP-101,606 nach intrastriatarer 6-OHDA-Läsion (N=8) auf den Gewebegehalt der Neurotransmitter NA, DA und 5-HT, sowie deren Metaboliten DOPAC, HVA und 5-HIAA im Vorderhirn [rCPu (A); cCPu (B), Acb (C), mPFC (D)] verglichen mit 50 % DMSO (N=8) bzw. mit 200 ng/ml CP-101,606 (N=8) behandelten Kontrolltieren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle-DMSO; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Kontrolle-200 CP (Tukey-Kramer *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

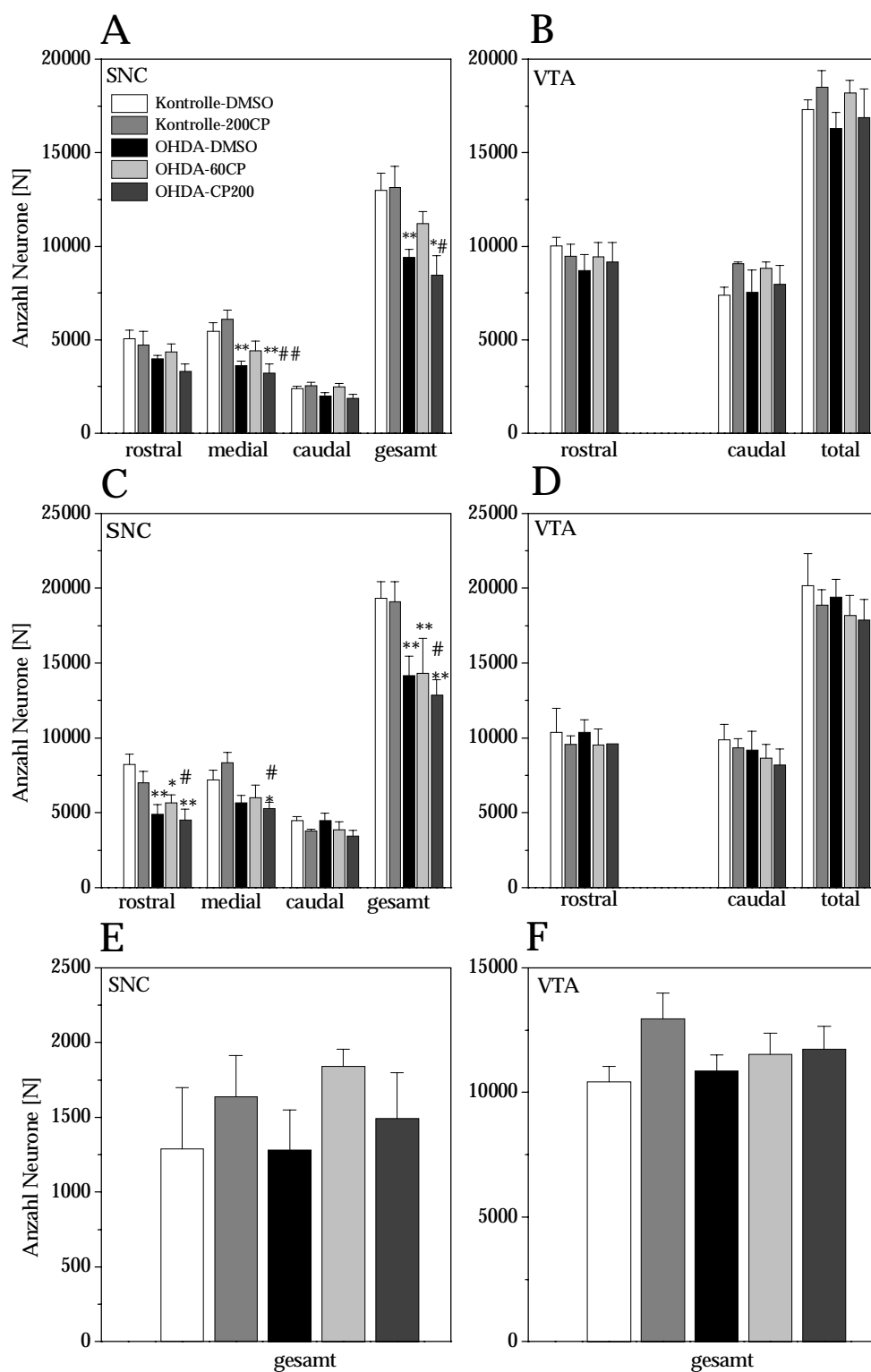


Abb. 44: Wirkung der chronischen Behandlung mit 60 ng/ml (N=7) und 200 ng/ml (N=6) CP-101,606 nach intrastriatärer 6-OHDA-Läsion (N=7) auf die absolute Anzahl von Neuronen in der SNC und im VTA [TH-positiv (A,B), Nissl-gefärbt (C,D) und Calbindin-positiv (E,F)] verglichen mit 50 % DMSO (N=7) bzw. mit 200 ng/ml CP-101,606 (N=6) behandelten Kontrolltieren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle-DMSO; # $p < 0.05$ vs. Kontrolle-200 CP (Kruskal-Wallis *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

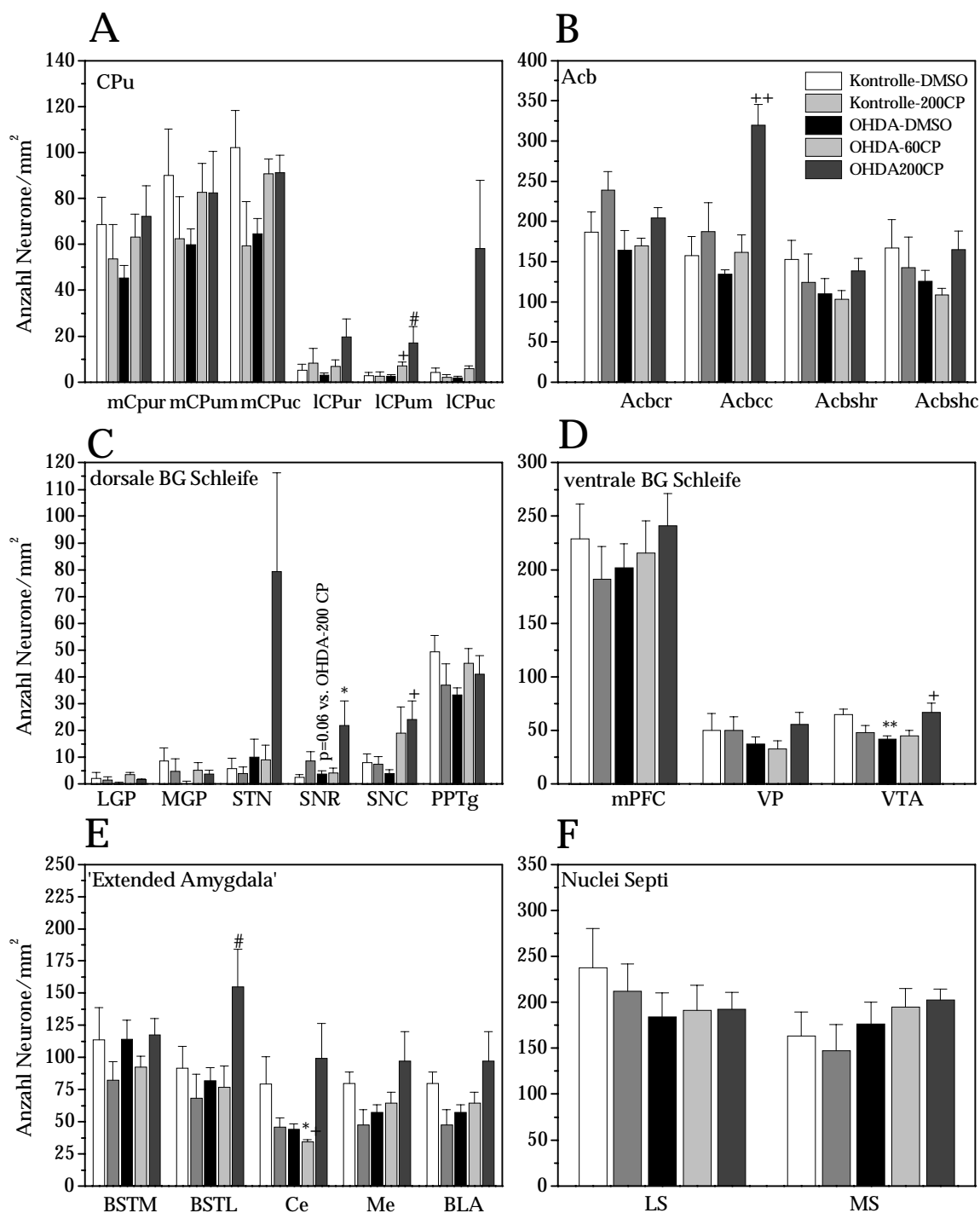


Abb. 45: Wirkung der chronischen Behandlung mit 60 ng/ml (N=7) und 200 ng/ml (N=6) CP-101,606 nach intrastriatraler 6-OHDA-Läsion (N=7) auf die numerische Dichte (Neurone/mm²) c-Fos-positiver Neurone im CPu (A), Acb (B), sowie ausgewählten Kerngebieten der dorsalen (C) und ventralen (D) Basalganglien Schleifen, der 'extended Amygdala' (E) und dem Septum (F), verglichen mit 50 % DMSO (N=7) bzw. mit 200 ng/ml CP-101,606 (N=6) behandelten Kontrolltieren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; * p<0.05, ** p<0.01 vs. Kontrolle-DMSO; # p<0.05 vs. Kontrolle-200 CP, + p<0.05, ++ p<0.01 vs. OHDA-DMSO (Kruskal-Wallis *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

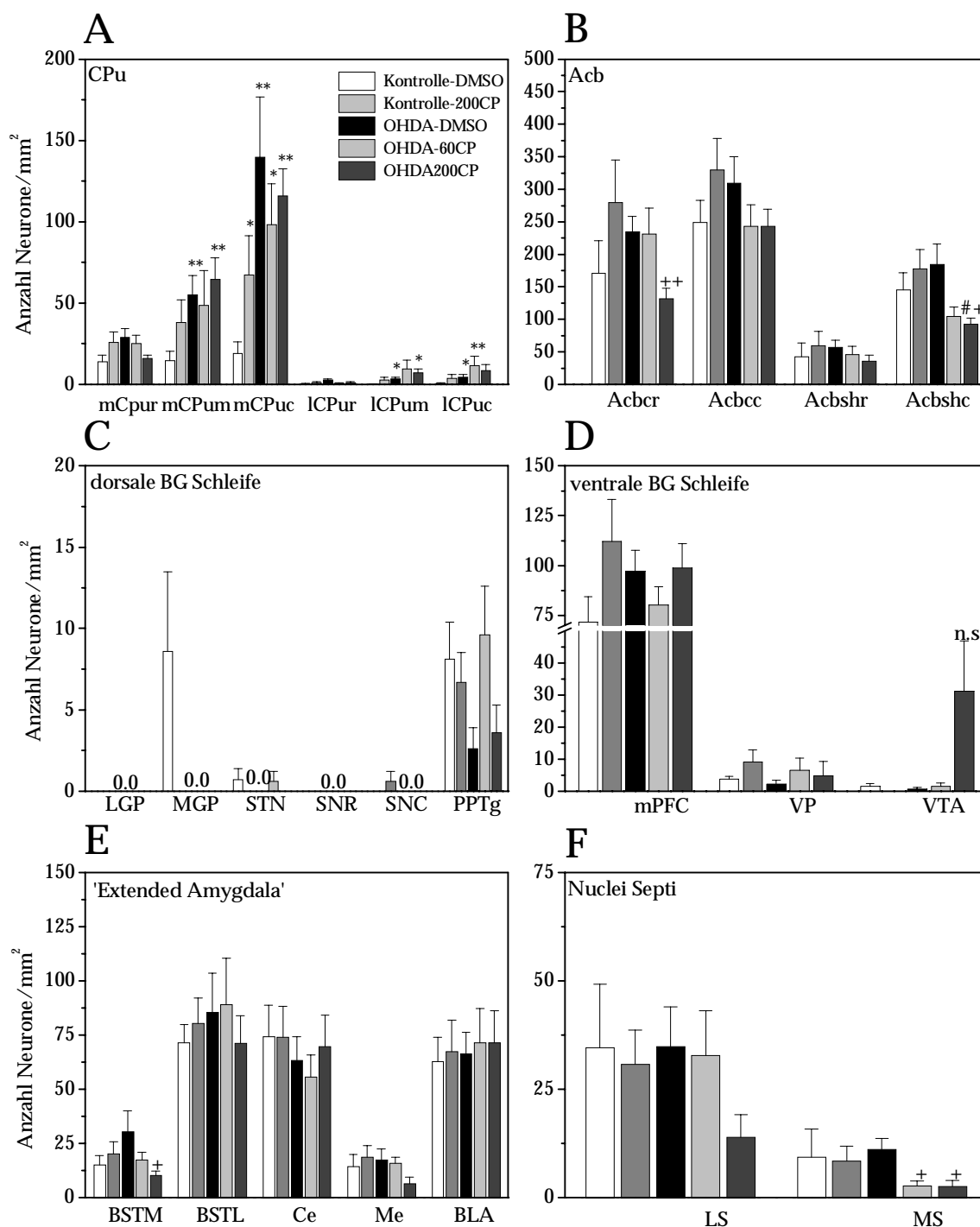


Abb. 46: Wirkung der chronischen Behandlung mit 60 ng/ml (N=7) und 200 ng/ml (N=6) CP-101,606 nach intrastratialer 6-OHDA-Läsion (N=7) auf die numerische Dichte (Neurone/mm²) FosB-positiver Neurone im CPu (A), Acb (B), sowie ausgewählten Kernengebieten der dorsalen (C) und ventralen (D) Basalganglien Schleifen, der ‚extended Amygdala‘ (E) und dem Septum (F), verglichen mit 50 % DMSO (N=7) bzw. mit 200 ng/ml CP-101,606 (N=6) behandelten Kontrolltieren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle-DMSO; # $p < 0.05$ vs. Kontrolle-200 CP, + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs. OHDA-DMSO (Kruskal-Wallis *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

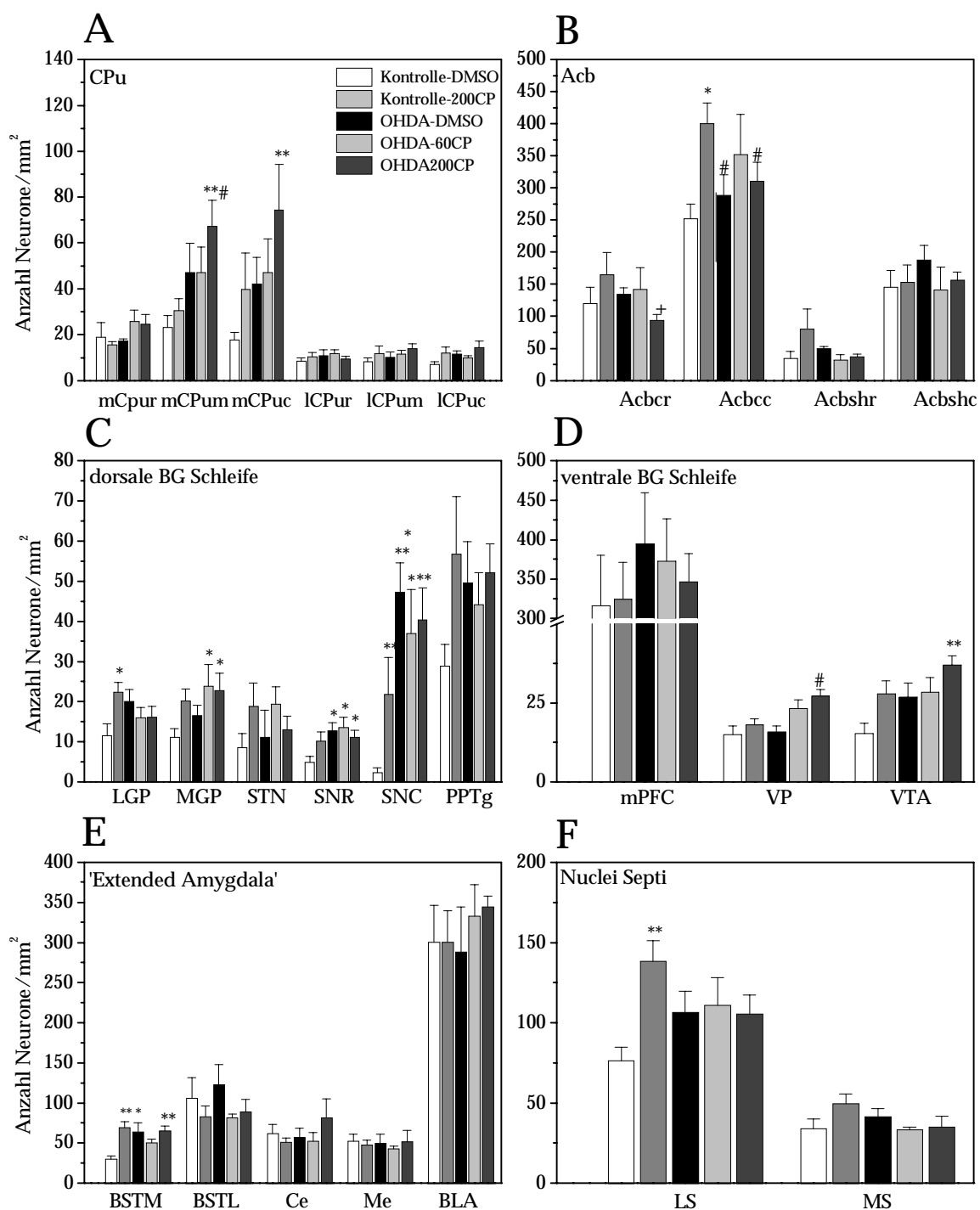


Abb. 47: Wirkung der chronischen Behandlung mit 60 ng/ml (N=7) und 200 ng/ml (N=6) CP-101,606 nach intrastratialer 6-OHDA-Läsion (N=7) auf die numerische Dichte (Neurone/mm²) c-Jun-positiver Neurone im CPu (A), Acb (B), sowie ausgewählten Kernengebieten der dorsalen (C) und ventralen (D) Basalganglien Schleifen, der ‚extended Amygdala‘ (E) und dem Septum (F), verglichen mit 50 % DMSO (N=7) bzw. mit 200 ng/ml CP-101,606 (N=6) behandelten Kontrolltieren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; * p<0.05, ** p<0.01 vs. Kontrolle-DMSO; # p<0.05 vs. Kontrolle-200 CP, + p<0.05 vs. OHDA-DMSO (Kruskal-Wallis *post-hoc* Test für paarweisen Vergleich).

Tabelle 12: Übersicht über die qualitative Zunahme der c-Fos, FosB und c-Jun Expression nach intrastriatler 6-OHDA-Läsion und chronischer Behandlung mit CP-101,606.

Gehirnregion	c-Fos	FosB	c-Jun
Cortex cerebri			
AI/DII	OHDA-DMSO/200CP: +	-	-
PRh	-	-	-
Cg1/2	-	-	-
M1/2	OHDA-DMSO/200CP: +	-	-
S1/2	OHDA-200CP: +	-	-
RSG/RSA	-	-	-
Au1/AuD/AuV	-	-	-
Ect	-	-	-
LEnt	OHDA-200CP: +	-	-
Pir	OHDA-200CP: +	-	Kontrolle-200CP, OHDA-DMSO/200CP: +
Telencephalon			
B	OHDA-200CP: +	-	Kontrolle-200CP: +
SI	-	-	-
Formatio hippocampi			
DG	-	-	OHDA-200CP: +
CA1	-	-	Kontrolle-200CP, OHDA-DMSO: +
CA2	-	-	-
CA3	-	-	-

Wirkung der chronischen Behandlung mit 60 ng/ml (N=6) und 200 ng/ml CP-101,606 (N=7) auf die qualitative Expression von c-Fos, FosB und c-Jun nach 6-OHDA-Läsion (N=7) verglichen mit 50 % DMSO (N=7) bzw. mit 200 ng/ml CP-101,606 (N=6) behandelten Kontrolltieren. Dargestellt ist die relative Zunahme der IR der angegebenen Behandlungsgruppe(n): - = keine Zunahme der IR; + = relative Zunahme. Für jedes Tier wurde zunächst die qualitative IR in der jeweiligen Region bewertet (3.9.1.) und daraus eine durchschnittliche qualitative IR für die Behandlungsgruppe ermittelt.

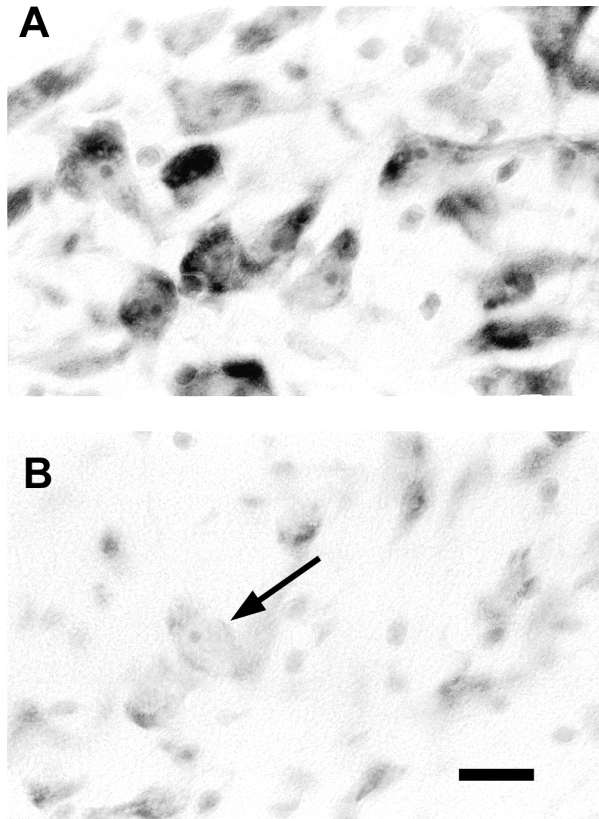


Abb. 48: Mikrophotographien der SNC (-5.30 mm kaudal von Bregma) 29 Tage nach bilateraler, intrastriatarer Infusion von 0.1 % Ascorbat (A) oder 6-OHDA (B). Die Nissl-Färbung zeigt deutlich in die Abnahme der zytoplasmatischen Nisslsubstanz in den verbleibenden Neuronen (Pfeil), mit intakter Kernmembran und Nucleolus (B). Massstab = 20 μ m.

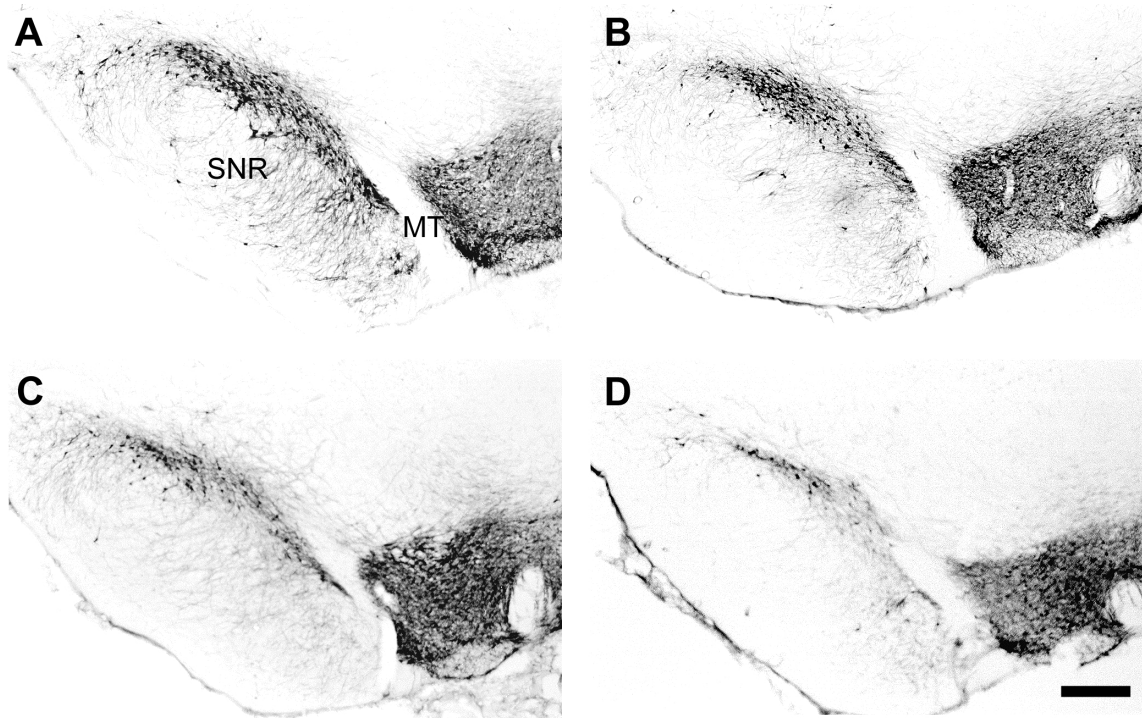


Abb. 49: Mikrophotographien koronaler Schnitte des ventralen Mesencephalons (-5.20 - -5.40 mm kaudal von Bregma) zeigen den Verlust TH-positiver Neurone in der SNC 29 Tage nach bilateraler intrastriatarer Infusion von 6-OHDA (B) verglichen mit der Infusion von 0.1 % Ascorbat (A) und die Effekte der chronischen Behandlung mit 60 ng/ml (C) und 200 ng/ml (D) CP-101,606. MT, Nucleus terminalis des akzessorischen optischen Systems; SNR, Substantia nigra pars reticulata. Massstab = 230 μ m.

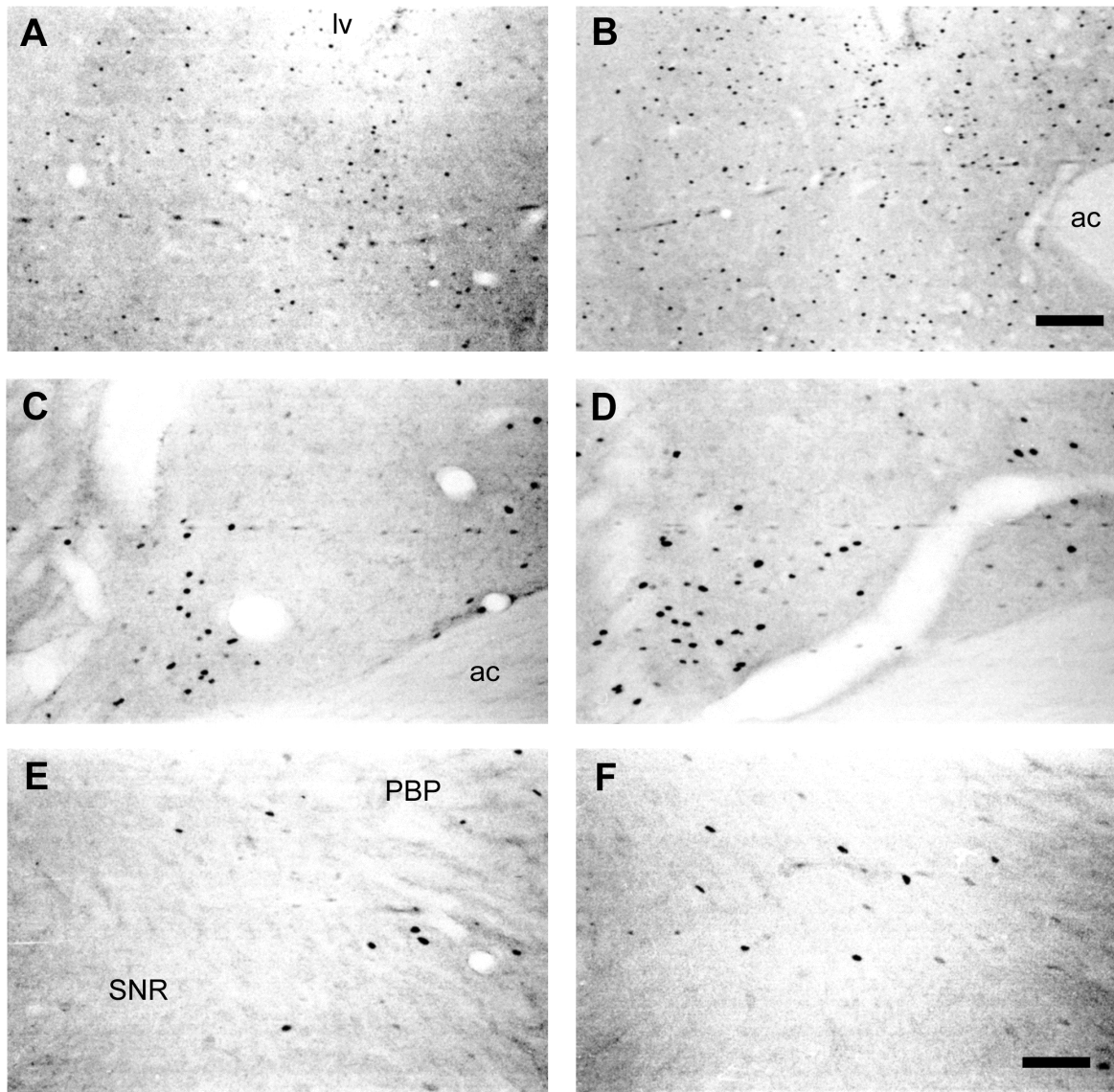


Abb. 50: Mikrophotographien koronaler Schnitte, die eine Zunahme der c-Fos IR nach chronischer Behandlung mit 200 ng/ml CP-101,606 (B, D, F) verglichen mit der 6-OHDA-bedingten (A, C, E) c-Fos IR im Acb (A, B), dem BSTL (C, D) und der SNC (E, F) zeigen. ac, Commissura anterior; lv, lateraler Ventrikel; PBP Nucleus pigmentosus parabrachialis; SNR, Substantia nigra pars reticulata. Masstäbe = 170 μ m (A-D), 90 μ m (E, F).

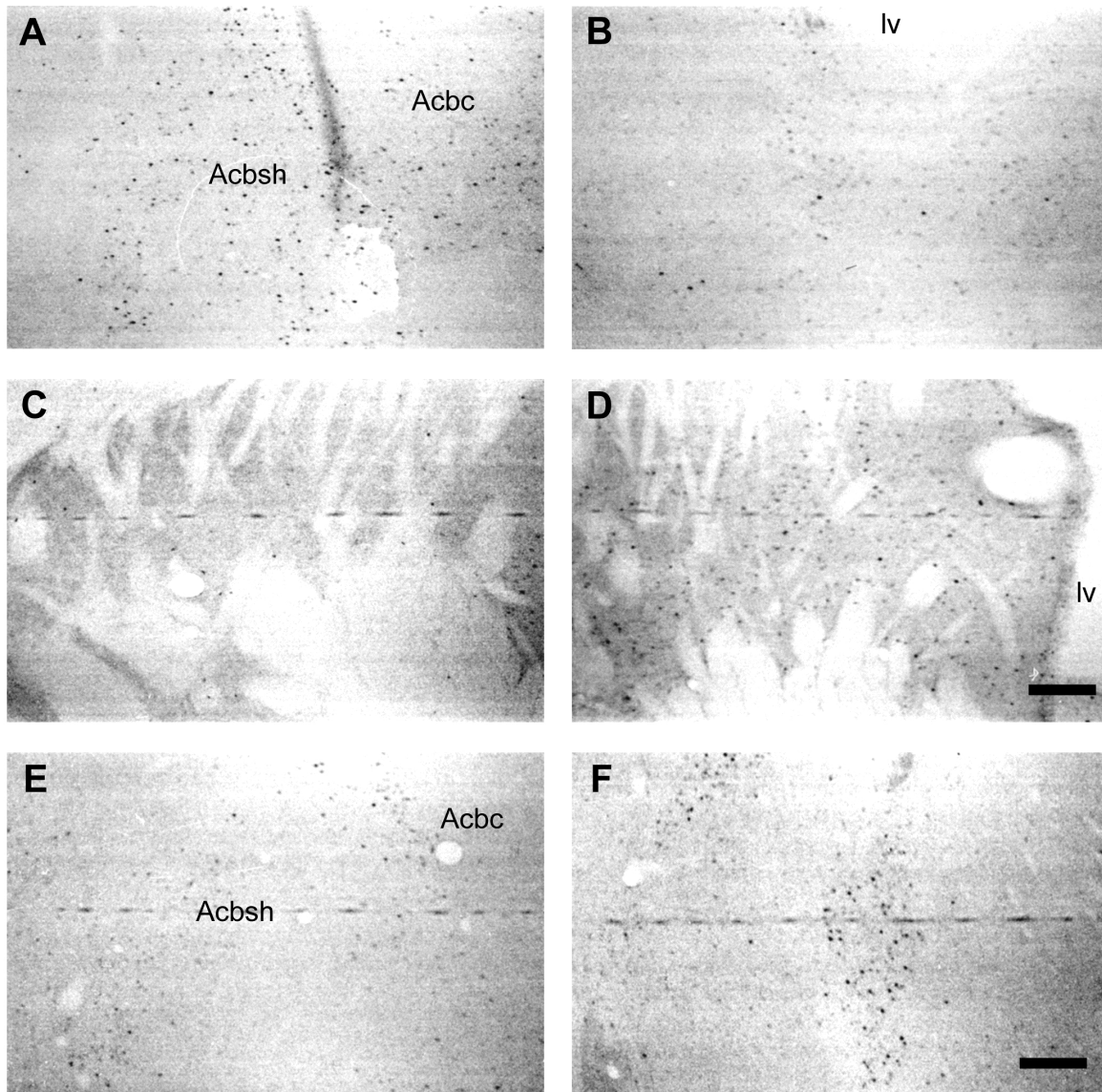


Abb. 51: Mikrophotographien koronarer Schnitte die die Effekte der chronischen Behandlung mit 200 ng/ml CP-101,606 (B, D, F) auf 6-OHDA-bedingte (A, C, E) Expression von FosB (A, B) und c-Jun (C-F) im Acb (A, B, E, F) und dem dorsalen CPU (C, D) zeigen. Acbc, Nucleus accumbens core Region; Acbsb, Nucleus accumbens shell Region; lv, lateraler Ventrikel. Massstäbe= 170 μ m (A, B, E, F), 230 μ m (C, D).

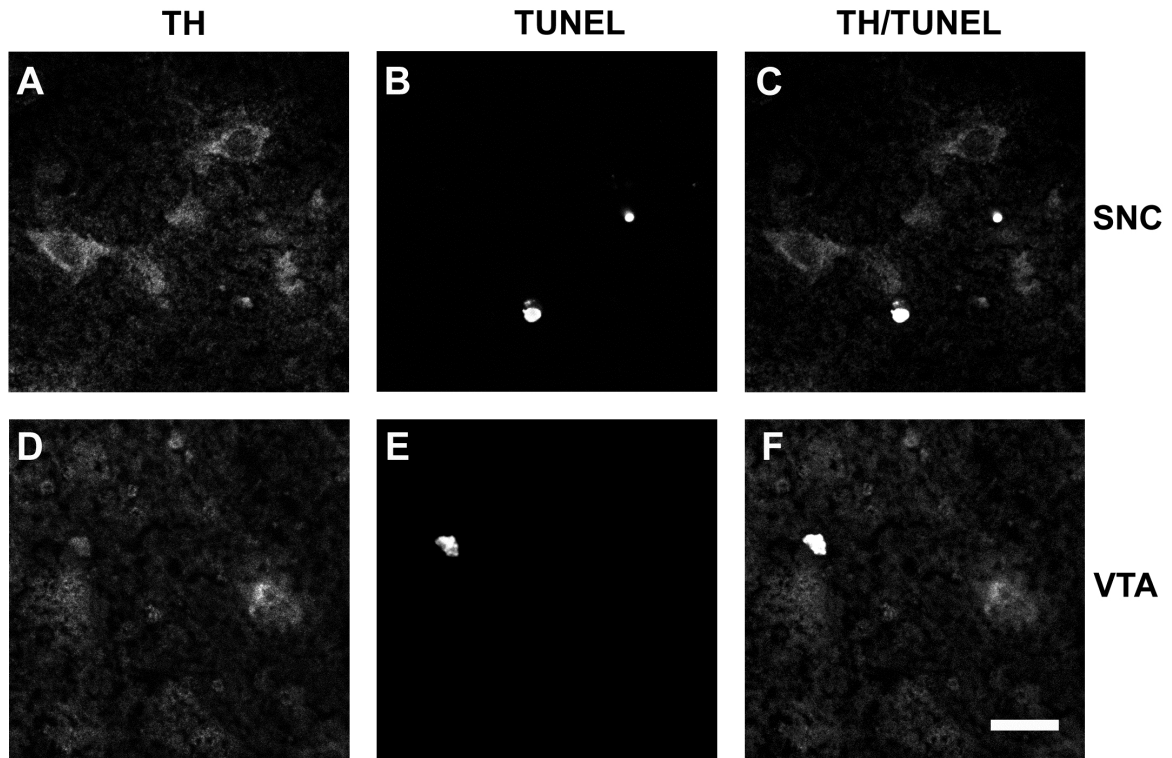


Abb. 52: Konfokale Mikrophotographien der SNC und dem VTA nach 29 Tage nach bilateraler intrastriatärer 6-OHDA Injektion, doppelgefärbt für TH und TUNEL. Die Färbung der TH zeigt sich ausschliesslich zytoplasmatisch (A, D), die TUNEL-Färbung ist (B, E) dagegen hauptsächlich jedoch nicht vollständig nucleär lokalisiert, was auf ein Auflösen der Kernmembran während des voranschreitenden Zelltodes hindeuten kann. Die Überlagerung (C, F) der Einzelfärbungen zeigt, dass die TUNEL-Färbung weder in der SNC noch im VTA in TH-positiven Neuronen kolokalisiert. Masstab = 20 μm .

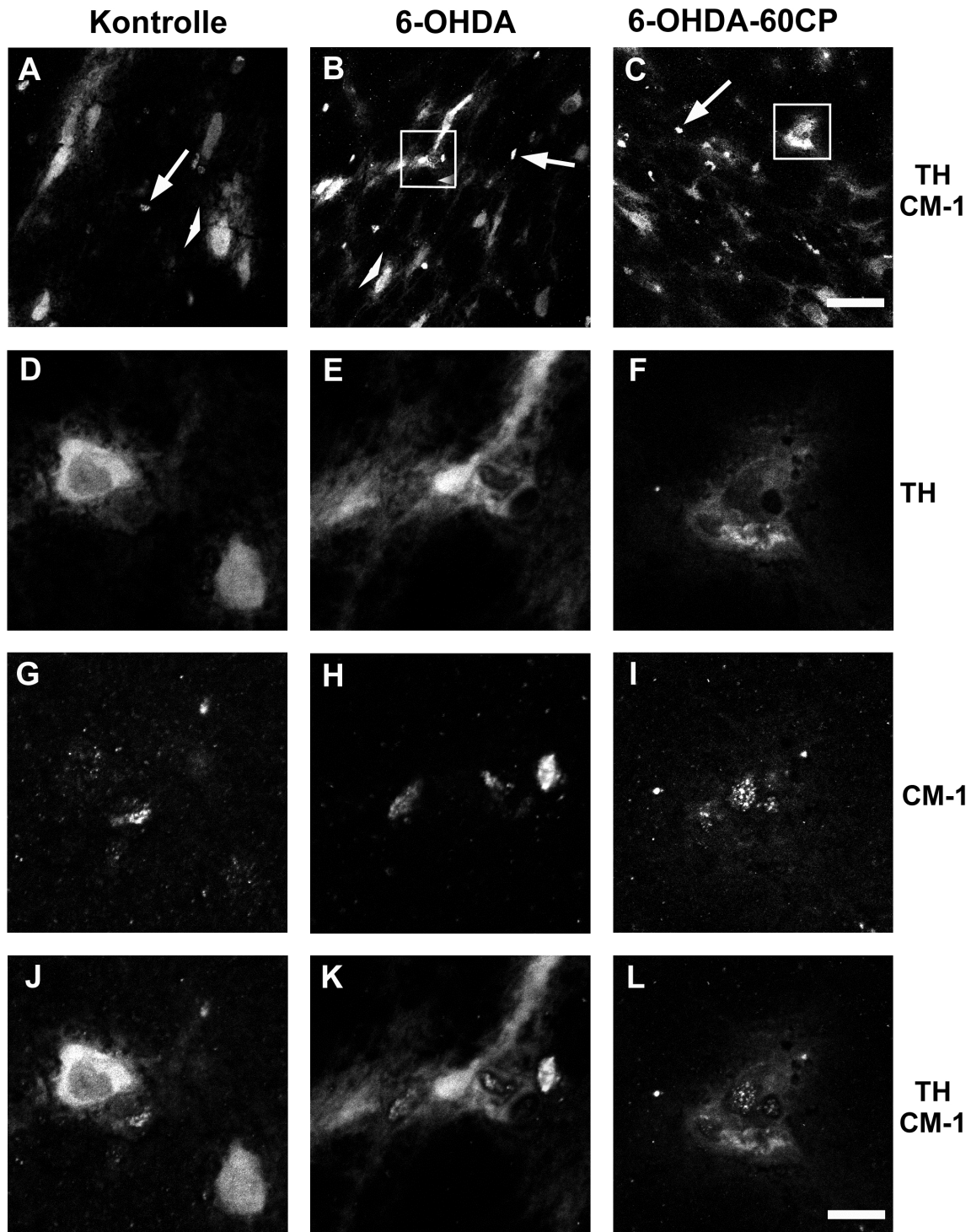


Abb. 53: Konfokale Mikrophotographien der SNC 29 Tage nach bilateraler intrastratialer Injektion von 0.1 % Ascorbat (A, D, G, J), 6-OHDA (B, E, H, K) und der anschliessenden Behandlung mit 60 ng/ml CP-101,606 (C, F, I, L), doppelgefärbt für TH und CM-1. Die Übersichten (A-C) zeigen eine schwache CM-1 IR (Pfeil), ausserhalb TH-positiver Neurone (Pfeilspitze) nach Scheinläsion (A). Nach 6-OHDA-Läsion (B) nimmt die CM-1 IR (Pfeil) zu, kolokalisiert jedoch nicht mit zytoplasmatischer TH IR (Pfeilspitze). Nach CP-Behandlung (C) zeigt sich in wenigen angeschnittenen Fortsätzen eine Kolokalisation von TH und CM-1 (Pfeil). In der Vergrösserung zeigen die Überlagerungen (J-L) der Einzelfärbungen, dass im Vergleich zu intakten TH-positiven Neuronen (D, J), die zytoplasmatische TH IR nach Läsion (E) vermindert ist und Vakuolisierungen aufweist, die CM-1 immunreaktiv sind (K). Qualitativ hat die Behandlung mit CP-101,606 keine Effekte auf die pathomorphologischen Veränderungen der TH-positiven Neurone und die intrazelluläre Vakuolisierung der CM-1 IR. Massstäbe = 40 μ m (A-C), 5 μ m (D-L).

6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Nachfolgend wird eine Zusammenfassung der Effekte der Behandlung mit dem NR2B-selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten CP-101,606 auf die 6-OHDA-Läsions-induzierten Veränderungen gegeben.

1. Der Grad der spontanen Katalepsie nach bilateraler intrastriärer Injektion von 6-OHDA nahm im Verlauf von 29 Tagen kontinuierlich zu, ohne eine wesentliche antikataleptische Wirkung der Behandlung mit CP-101,606. Die chronische Behandlung mit CP-101,606 hatte selbst keinen prokataleptischer Effekt auf die Kontrolltieren oder lädierten Tieren.
2. Die 6-OHDA-Läsion induzierte eine kontinuierliche Abnahme der Vorwärtslokomotion und vertikalen Exploration, auf die die chronische Behandlung mit CP-101,606 keine Wirkung hatte. Sowohl die 6-OHDA-Läsion als auch die chronische Behandlung mit CP-101,606 verhinderten die Habituation der Lokomotion und Exploration als Folge wiederholten Testens, wie sie bei den DMSO-behandelten Kontrolltieren zu beobachten war.
3. Die 6-OHDA-Läsion führte zu einem Verlust der DAergen Innervation im kaudalen CPU (~ 30 % der Kontrolle) mit entsprechender Abnahme der Gewebegehalte von DOPAC und HVA, worauf die Behandlung mit CP-101,606 keinen Einfluss hatte. Geringere Auswirkungen hatte die 6-OHDA auf die DAerge Transmission im Acb (Abnahme von HVA) ohne weitere Effekte der CP-Behandlung. Im mPFC waren nach der 6-OHDA die NAerge und DAerge Transmission erhöht, die Behandlung mit CP-101,606 dagegen reduziert diese unter den Gehalt der Kontrolltiere.
4. Parallel hierzu induzierte die intrastriäre 6-OHDA Injektion einen Verlust TH-positiver Neurone in der SNC (~ 40 % der Kontrolle), die Anzahl Nissl-gefärbter Neurone in der SNC war entsprechend vermindert (~ 35 %). Ein neuroprotektiver Effekte der Behandlung mit CP-101,606 konnte nicht gezeigt werden.
5. Die intrastriäre 6-OHDA Injektion induzierte nach 29 Tagen DNA-Fragmentationen (nachgewiesen mit der TUNEL-Färbung) in TH-negativen Neuronen der SNC und des VTA. Gleichzeitig konnte das aktivierte Caspase-3 Fragment p20 in TH-positiven Neuronen der SNC qualitativ nachgewiesen werden, die darüberhinaus morphologische Veränderungen wie zytoplasmatische Vakuolisierung und eine verminderte TH IR zeigten. Die Behandlung mit CP-101,606 hatte auf diese zellulären Anzeichen voranschreitender Degeneration keine Auswirkungen.
6. Die chronische Behandlung mit 200 ng/ml CP-101,606 nach 6-OHDA-Läsion induzierte eine konsistente Aufregulation der Expression von c-Fos in den Eingangskernen der dorsalen und ventralen Basalganglienschleife (CPU, ACb), im Mittelhirn (SNC, VTA) und im zentralen EA Komplex (BSTL), verglichen mit der c-Fos Expression nach 6-OHDA-Läsion (Abb. 54). Im medialen CPU induzierte sowohl die 6-OHDA-Läsion als auch die CP-Behandlung eine anhaltende FosB Expression. Die Läsions-bedingte Expression von FosB im Acb sowie im medialen EA Komplex (BSTM) und im medialen Septum wurde durch die chronische Behandlung mit 200 ng/ml CP-101,606 reduziert (Abb. 55B). Weniger einheitliche Effekte hatte die CP-Behandlung auf die Expression von c-Jun: im Acb reduzierten chronische 200ng/ml CP-101,606 nach Läsion die c-Jun Expression, im medialen CPU, und im VP war c-Jun anhaltend verstärkt exprimiert (Abb. 54). Weiterhin

induzierte die CP-Behandlung nach 6-OHDA-Läsion, aber auch im intakten Tier eine anhaltende c-Jun Aktivierung im MGP, der SNR, dem VTA und der SNC, im PPTg und im BSTM.

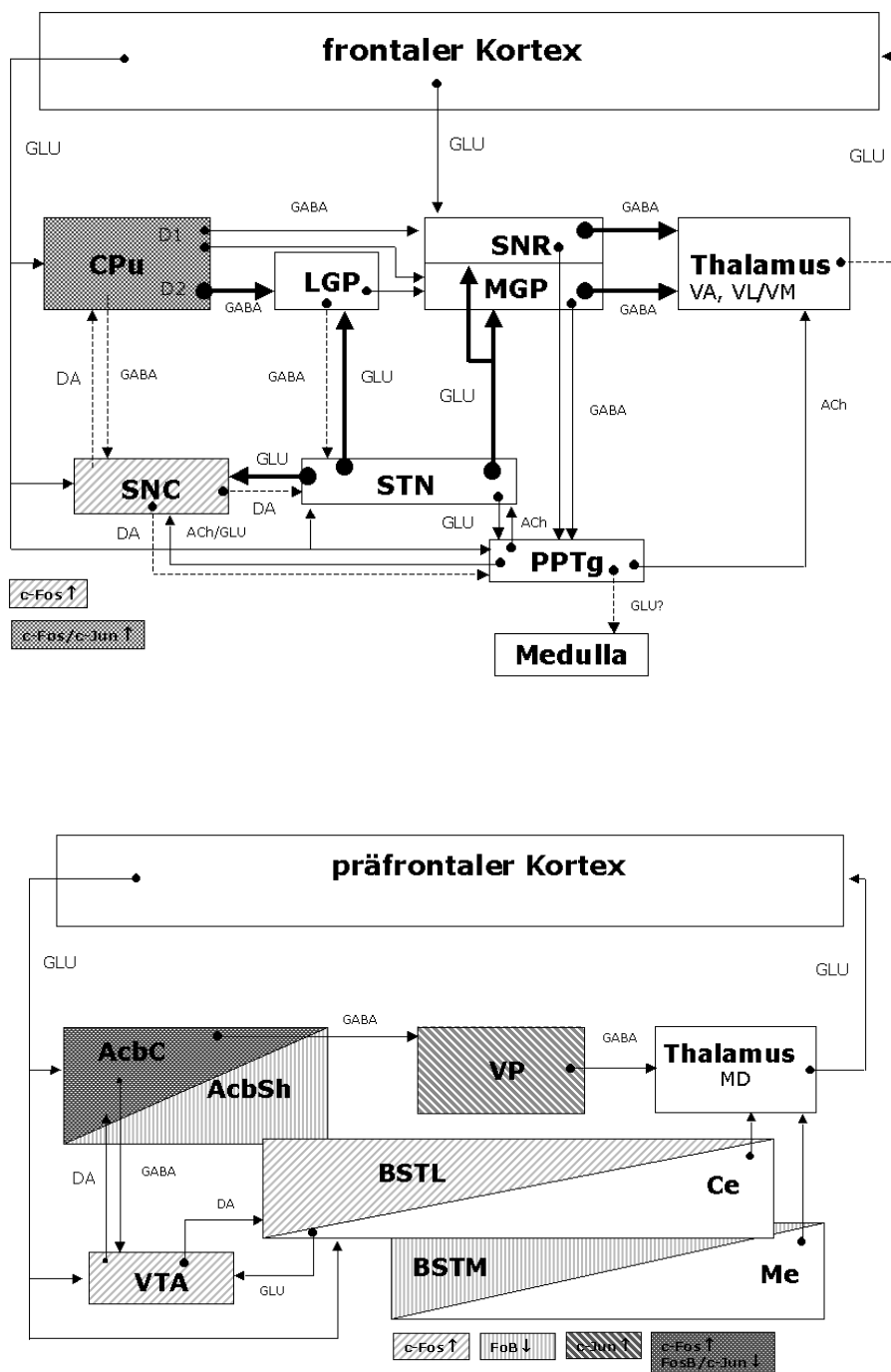


Abb. 54: Zusammenfassende Darstellung der Effekte der chronischen Behandlung mit 200 ng/ml CP-101,606 auf die 6-OHDA-bedingte Expression der iTFs c-Fos, FosB und c-Jun in der dorsalen und ventralen Schleife der Basalganglien 29 Tage nach bilateraler intrastriärer 6-OHDA Injektion. Acbc, Nucleus accumbens core Region; Acbsh, Nucleus accumbens shell region; BSTL/M, Nucleus interstitialis striae terminalis laterale/mediale Division; Ce/Me, Corpus amygdaloideum nucleus centralis/medialis; CPu, Nucleus caudatus/putamen; LGP, Globus pallidus pars lateralis; MD; Nucleus mediodorsalis thalami; MGP, Globus pallidus pars medialis; PPTg, Nucleus tegmentalis pedunculopontinus; SNC, Substantia nigra pars compacta; SNR, Substantia nigra pars reticulata; STN, Nucleus subthalamicus; VP, Pallidum ventrale; VA/VL/VM, Nucleus ventroanterior/ventrolateralis/ventromedialis thalami; ACh, Acetylcholin; DA, Dopamin; GABA, γ-Aminobuttersäure; GLU, Glutamat; Dicke Pfeile: Überaktivität; gestrichelte Pfeile: Unteraktivität (nach Pedersen und Schmidt, 2000a; Schmidt et al., 1992, ergänzt nach Alheid et al., 1995; Alheid und Heimer, 1988)

6.5. Diskussion

Die chronische Behandlung mit dem NR2B-selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten CP-101,606 über 3 Wochen hat keine antiparkinsonoide Wirkung auf die Verhaltensdefizite, die durch eine partielle bilaterale striatonigrale Degeneration ausgelöst wurden. Ebenso wenig kann die NR2B-selektive Blockade der GLUergen Transmission die Degeneration der DAergen Neurone in der SNC vermindern und die DAerge Denervation des Vorderhirns aufhalten, noch kompensatorische Prozesse induzieren oder unterstützen. Qualitativ hat die Behandlung mit CP-101,606 keinen Einfluss auf die Aktivierung von Caspase-3, DNA-Fragmentationen oder pathomorphologische Veränderungen in Neuronen der SNC, die mit der retrograde Degeneration assoziiert sind. Die neuronale Aktivität striataler Neurone wird durch den NR2B-selektiven Antagonisten nach 6-OHDA-Läsion regionspezifisch, teilweise dosisabhängig, erhöht. Ähnliche Beobachtungen mit wenigen Ausnahmen werden auch in den striatalen Projektionskernen bzw. den Ausgangskernen der Basalganglien sowie den eng assoziierten Kernen der EA gemacht.

Effekte von CP-101,606 auf die 6-OHDA-induzierten Verhaltensdefizite

Die Untersuchungen der Spontanaktivität und der Katalepsie zeigt, dass bereits 8 Tage nach der bilateralen intrastriatalen 6-OHDA-Läsion ausgeprägte Defizite in der Bewegungsinitiation sowie eine verminderte Lokomotion und Exploration durch die DAerge Denervation hervorgerufen werden. Diese Verhaltensdefizite nehmen im Beobachtungszeitraum weiter zu, was für die progressive Degeneration der DAergen Innervation im Vorderhirn spricht und die bereits erhobenen Befunde aus den vorangegangenen Experimenten unterstützt. Auch hier stellt demnach die Behandlung mit dem NR2B-selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten CP-101,606 einen ‚frühen‘ pharmakologischen Eingriff in die sich verändernde Transmitterbalance in den Kernen der Basalganglien dar und erfüllt demnach die Forderung für eine mögliche klinische Relevanz, wonach eine Verminderung der GLUergen Überaktivität bereits zu einem frühen klinischen Stadium der Erkrankung die Progression beeinflussen kann (Blandini et al., 2000a).

Die Verhaltensexperimente zeigen, dass keine der beiden eingesetzten Dosierungen von CP-101,606 eine antiparkinsonoide Wirkung haben, in dem Sinn, dass entweder der Grad der spontanen Katalepsie vermindert wird, oder die Spontanaktivität erhöht wird. Der ED₅₀-Wert für CP-101,606 zur Inhibition einer Haloperidol-induzierten (0.5 – 1.0 mg/kg) Katalepsie beträgt bei der Ratte 0.5 mg/kg s.c. (Steece-Collier et al., 2000). Das hier angewandte chronische Dosierungsregim mittels subkutaner miniosmotischer Pumpen sollte einen kontinuierlichen Plasmaspiegel von 200 ng/ml bzw. 60 ng/ml erreichen, was einer Dosierung von 1.45 mg/kg/h bzw. 0.44 mg/kg/h aktiver Substanz entspricht (Menniti et al., 2000) und damit im Dosisbereich für eine antikataleptische Wirkung liegt. Desweiteren liegen diese Dosierungen in einem Wirkungsbereich, in dem sie die NMDA-Rezeptor-vermittelte Induktion von c-fos mRNA nach systemischer NMDA-Applikation, fokaler Ischämie und elektrisch-induzierten kortikalen Entladungen im Hippokampus und parietalen Kortex ähnlich wie MK-801 inhibieren konnten (Menniti et al., 2000), womit auch gezeigt wurde, dass die NR2B-selektive Blockade des NMDA-Rezeptors die GLUerge Überstimulation effektiv zu inhibieren vermag. Demnach lassen sich die ausbleibenden

Effekte auf die Verhaltensdefizite nicht durch eine mangelnde oder unspezifische Dosierung der Substanz erklären. Weiterhin zeigte eine akute Dosierung von 1 mg/kg CP-101,606 antiparkinsonoide Effekte im MPTP-behandelten Affen mit einer subtotalen DA-Denervation und potenzierte darüberhinaus die Wirkung von L-DOPA auf die Parkinson-Symptome (Steece-Collier et al., 2000), was deutlich macht, dass CP-101,606 auch im DA denervierten Tier antiparkinsonoid wirksam ist. Ähnlich konnte für Ifenprodil, den Prototyp der NR2B-selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten (Williams, 1993), antiparkinsonoide Wirkungen in der Reserpin-behandelten Ratte sowie im bilateral 6-OHDA-lädierten oder MPTP-behandelten Affen nachgewiesen werden (Mitchell und Carroll, 1997; Nash et al., 1999; Nash et al., 2000). Diese Befunde können durch die hier erhobenen Daten nicht unterstützt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür mag sein, dass die Verhaltensdefizite, die nach der partiellen striatonigralen Läsion beobachtet werden hauptsächlich durch die Abnahme des DAergen Tonus (~ 70 %) im Striatum ausgelöst werden und die GLUerge Überaktivität im Striatum noch keinen Beitrag zu den Verhaltensdefiziten leistet. Entsprechend hat eine selektive Inhibition der GLUergen Transmission keine wesentlichen Effekte auf die Verhaltensdefizite. Im Gegensatz dazu erfolgte in oben angeführten Studien die NR2B-Inhibition mit Ifenprodil und seinem Derivat CP-101,606 nach schwerer bis vollständiger DA-Denervation bzw. umfassender DA D2-Rezeptor Blockade, so dass hier eine GLUerge Überaktivität implikativ ist. Daher können unterschiedliche Läsions- und Verhaltensparadigmen die Ursache für die Diskrepanz zwischen den hier erhobenen Verhaltensbefunden und den angeführten Studien. In diesem Zusammenhang gilt zu erwähnen, dass in der einzigen klinischen präliminären Studie, in der ein NR2B-selektiver NMDA-Rezeptor-Antagonist als zusätzliche Therapie zu L-DOPA eingesetzt wurde, Ifenprodil keine Verbesserung der Parkinson-Symptome bewirkte (Montastruc et al., 1992). Dies macht jedoch auch deutlich, dass bisherige tierexperimentelle Befunde nicht unbedingt prädiktiv für die antiparkinsonoide Wirkung der NR2B-selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten sind.

Eine weitere Ursache für ausbleibende Behandlungseffekte mag in der Zusammensetzung der striatalen NMDA-Rezeptoren liegen. Mehrere Untersuchungen zeigten zunächst entweder eine Zunahme der NR1 mRNA (Andrés et al., 1996; Rodríguez-Puertas et al., 1999; Tremblay et al., 1995), keine Veränderungen der NR1, NR2A und NR2B Proteine im Gesamtextrakt (Dunah et al., 2000; Menegoz et al., 1995) bzw. der [¹²⁵I]MK-801-Bindung im Striatum (Araki et al., 2000; He et al., 2000b) oder nur eine Zunahme des NR2A Proteins (Oh et al., 1998) nach DA-Denervation. Dies lässt sich nicht unbedingt konsistent als eine Auf- oder Ab-Regulation der striatalen NMDA-Rezeptoren diskutieren. Allerdings wurde auch gezeigt, dass die DA-Denervation mit 6-OHDA eine selektive Abnahme der membrangebundenen NR1 SUs und NR2B SUs jedoch nicht NR2A SUs im Striatum bewirkt, wobei die Gesamtproteinmenge der SUs unverändert war (Dunah et al., 2000). Dies spricht für eine intrazelluläre Redistribution der NR1/NR2B-Rezeptoren und damit eine funktionelle Veränderung der GLUergen Transmission auf striatale Projektionsneurone. Folglich würde die Abnahme der membranständigen NR1/NR2B-Subtypen der NMDA-Rezeptoren die ausbleibenden Effekte von CP-101,606 auf die Verhaltensdefizite erklären, da weniger Polyaminbindungsstellen vorliegen, die die Antagonisten Wirkung vermitteln können.

Die vorliegenden Verhaltensexperimente zeigen jedoch auch, dass die chronische NR2B-selektive Inhibition des NMDA-Rezeptors weder im intakten noch im DA-defizienten Tier psychotomimetische, sedative oder ataktische Nebenwirkungen hervorruft, oder möglicherweise prokataleptische Effekte hat. Dies unterstützt somit vorangegangene Studien, die die gute Verträglichkeit von CP-101,606 nach akuter Behandlung im Tierversuch zeigten (Menniti et al., 2000; Steece-Collier et al., 2000). Zusammengenommen können die Verhaltensexperimente keine antiparkinsonoide Wirkung des NR2B-selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten CP-101,606 im Tiermodell der bilateralen partiellen striatonigralen Degeneration zeigen. Dies steht zwar im Widerspruch zu den wenigen bisher erhobenen tierexperimentellen Befunden, muss aber nicht grundsätzlich prädiktiv für eine fehlende antiparkinsonoide Wirkung dieser selektiven Blockade der GLUergen Überaktivität sein.

CP-101,606 zeigt keine neuroprotektive Wirkung im ventralen Mesencephalon und keine Wiederherstellung der DAergen Innervation im Vorderhirn

Die histologische Analyse des ventralen Mesencephalons zeigt keine protektiven Effekte der chronischen Behandlung mit CP-101,606 auf den 6-OHDA-induzierten Verlust (~ 40 %) TH-positiver Neurone in der SNC, entsprechend war die Gesamtzahl der SNC Neurone unverändert. Diese Befunde korrelieren mit der neurochemischen Untersuchung des DA-Gehalts im dorsalen CPu, wo der ausgeprägte Verlust von ~ 60 % auch nach der Behandlung mit CP-101,606 erhalten bleibt. Demnach kann eine NR2B-selektive Inhibition der GLUergen Transmission im ventralen Mesencephalon zu einem frühen Zeitpunkt der retrograden striatonigralen Läsion die Degeneration der SNC Neurone und den korrespondierenden Verlust der DAergen Innervation des Vorderhirns nicht verhindern.

Das neuroprotektive Potential von CP-101,606 gegenüber dem GLU-induzierten neuronalen Zelltod und Neurodegeneration konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Zusammenfassung in Chenard und Menniti, 1999). CP-101,606 schützte primäre hippokampale Neurone vor akuter GLU-Toxizität (Menniti et al., 1997), reduzierte die Infarktgrösse nach permanentem Verschluss der zerebralen Mittelarterie (Di et al., 1997) und reduzierte die funktionellen Defizite im Morris-Wasser-Labyrinth nach experimentellem Hirntrauma (Okiyama et al., 1997). Bisherige Untersuchungen zur Wirkung von CP-101,606 oder auch Ifenprodil in Tiermodellen der Parkinson-Krankheit wurden nicht im Hinblick auf die neuroprotektive Wirkung der Antagonisten durchgeführt, so dass ein unmittelbarer Vergleich nicht möglich ist. Neuroanatomische Studien, die die Verteilung der NMDA-Rezeptor Untereinheiten in der SNC und im VTA untersucht haben, machen jedoch deutlich, warum NR2B-selektive NMDA-Rezeptor-Antagonisten im Vorderhirn protektiv sind, aber nicht wie hier gezeigt in der SNC. Die NR2B-SU des NMDA-Rezeptors wird konsistent nur in sehr geringer Menge von Neuronen der SNC und des VTA bei der Ratte (Albers et al., 1999; Petralia et al., 1994; Standaert et al., 1994; Yung, 1998) beim Affen (Paquet et al., 1997) und auch beim Menschen (Counihan et al., 1998) exprimiert. Diese Studien deuten vielmehr darauf hin, dass sich funktionelle NMDA-Rezeptoren im ventralen Mesencephalon als NR1/NR2D/NR2C Heterooligomere zusammensetzen (Counihan et al., 1998; Standaert et al., 1994). Die Untersuchungen zur subzelluläre Verteilung zeigte weiterhin, dass eine geringe Anzahl präterminaler Axone und Axonterminalen immunoreaktiv für die NR1 SU sind, was neben einer Verteilung auf dem Perikaryon und den proximalen Dendriten auf eine geringe präsynaptische Lokalisation von NMDA-Rezeptoren deutet (Paquet et al., 1997).

Diese Studien zeigen demnach, dass die NR2B SU bei der GLUergen Transmission in Neuronen der SNC und des VTA keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt und entsprechend wenig zur Degeneration, die durch die postulierte GLUerge Überaktivität angetrieben wird, beiträgt. Auf der Basis der neuroanatomischen Grundlagen und der hier erhobenen Daten erscheint daher der Einsatz NR2B-selektiver NMDA-Rezeptor-Antagonisten zur spezifischen Protektion mesencephaler Neurone bei der Parkinson-Krankheit fragwürdig.

Die fehlende Expression der NR2B-SU im ventralen Mesencephalon ist wahrscheinlich auch der Grund dafür, dass die chronische Behandlung mit CP-101,606 keinen Einfluss auf kompensatorische Mechanismen, wie einen erhöhten DA-Metabolismus im dorsalen CPu, axonales ‚sprouting‘ im Acb (siehe 5.5) oder auch eine Veränderung der Expression von CB in Neuronen der SNC und dem VTA (siehe 4.5.) hat. Auf der anderen Seite unterstützt die Beobachtung, dass die chronische Behandlung mit CP-101,606 im intakten Tier keinerlei Veränderungen im Gehalt an biogenen Aminen im Vorderhirn oder pathologische Veränderungen im ventralen Mesencephalon hervorruft, das fehlende neurotoxische Potential dieser Substanzklasse (Scatton, 1994) auch wenn entsprechende Untersuchungen in den NR2B-reichen Regionen des Vorderhirn die klinische Sicherheit zunächst im Tierversuch noch zeigen müssen.

Aktivierung von Caspase-3 und DNA-Fragmentation charakterisieren die ‚nigrale‘ Pathologie

Die immunhistochemischen und biochemischen Untersuchungen zum Nachweis von aktivierter Caspase-3 und DNA-Fragmentationen zeigt, dass die retrograde striatonigrale Degeneration apoptotische Prozesse in den Neuronen der SNC auslöst. Der hier eingesetzte CM-1 Antikörper erkennt spezifisch das proteolytisch aktive p20 Fragment der Caspase-3 (Kermer et al., 1999; Namura et al., 1998; Srinivasan et al., 1998), das wiederum unmittelbar an der Exekution des apoptotischen Zelltods während der Entwicklung und im pathologischen Zustand beteiligt ist (Zusammenfassungen in Hengartner, 2000; Nicholson, 1999; Yuan und Yankner, 2000). Nach intrastriatler 6-OHDA Injektion wird aktivierte Caspase-3 sowohl im neuronalen Perikaryon, als auch kolokalisiert mit TH im Bereich der proximalen Neuriten nachgewiesen, was bereits als spezifisches Signal während des entwicklungsbedingten apoptotischen Zelltods nachgewiesen wurde (Srinivasan et al., 1998). Die Immunfluoreszenz Doppelfärbung zeigt, dass das p20 Fragment der Caspase-3 vakuolisiert im Zytoplasma der TH-positiven Neurone vorliegt. Diese Neurone weisen darüberhinaus nur eine schwache TH IR auf, bei einer allgemeinen pathologischen Morphologie mit aufgelöster Kernmembran, was ebenfalls ein klassisches Merkmal des apoptotischen Zelltods ist (Wyllie et al., 1980). Die Beobachtung, dass die anhaltende Pathomorphologie weniger SNC Neurone mit einer Abnahme der TH Expression verbunden ist, steht im Einklang mit den Befunden der vorangegangenen Experimente (siehe 4. und 5.) und mit bisherigen tierexperimentellen Studien (Ichitani et al., 1994; Marti et al., 2000; Zuch et al., 2000). Der Nachweis aktivierter Caspase-3 deutet weiter darauf hin, dass die 6-OHDA-induzierte retrograde Degeneration der SNC Neurone zumindest teilweise durch die Aktivierung des apoptotischen Zelltods vermittelt wird. Dies wird unterstützt durch *in vitro* Studien, die zeigten, dass der 6-OHDA-induzierte Zelltod DAerger Neurone durch die Familie der Caspase-3 Proteasen vermittelt wird (Dodel et al., 1999; Ochu et al., 1998) und eine *in vivo* Studie, in der die retrograde Degeneration der SNC nach intrastriatler 6-OHDA

Injektion durch einen Breitspektrum Caspase-Inhibitor verhindert wurde (Cutillas et al., 1999).

Der Nachweis von DNA-Fragmentation in Neuronen der SNC mittels der TUNEL-Methode zeigt apoptotische Kerne –kondensiert oder vakuolisiert, teilweise mit degradierte Kernmembran- in geringem Umfang nach der intrastriatalen 6-OHDA Injektion, die allerdings nicht mit TH IR kolokalisiert war. Die Beobachtung, dass dem apoptotischen Zelltod in der SNC nach retrograder 6-OHDA Degeneration ein Verlust der TH IR vorausgeht (Kirik et al., 1998; Marti et al., 2000; Zuch et al., 2000) lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den TUNEL-positiven Neuronen um ehemals TH-positive Neurone handelt, die zu diesem fortgeschrittenen Stadium der Degeneration bereits ihren Phänotypen, und damit ihre Funktionalität verloren haben. Im Gegensatz dazu, wird aktivierte Caspase-3 in ‚noch‘ TH-positiven Neuronen nachgewiesen, was auf einen zeitlich abgestimmten Prozess hindeutet, in dem die Aktivierung des Caspase-3 Zymogens der DNA-Fragmentation vorangeht und möglicherweise zum proteolytischen Abbau des TH-Enzyms beiträgt. Kermer und Kollegen konnten eine ähnliche zeitliche Abfolge von Caspase-3 Aktivierung und DNA-Fragmentation nach Axotomie in retinalen Ganglienzellen nachweisen (Kermer et al., 1999) und schlossen daraus, dass Caspase-3 entscheidend zur Exekution des Zelltodes nach Axotomie beiträgt. Eine vergleichbare Studie an axotomierten Motoneuronen konnte die Vermutung bestätigen, dass die Degradation der Zell- und Kernkompartimentierung die Aktivierung von Caspase-3 erfordert, die damit eine entscheidende Rolle bei der Axotomie-induzierten neuronalen Apoptose spielt (Vanderluit et al., 2000). Im Einklang mit bisherigen *in vivo* Studien, die Caspase-3-vermittelte Prozesse im neuronalen Zelltod nach MPP⁺- oder 6-OHDA-Intoxikation nachgewiesen haben, zeigen die vorliegenden Beobachtungen, dass auch noch in einem Zeitraum von 4 Wochen nach Intoxikation ein verzögerter apoptotischer Zelltod zur Degeneration der SNC beiträgt.

Diese Beobachtungen deuten zunächst auf einen degenerativen Prozess hin, der durch die Intoxikation mit 6-OHDA im Bereich der Axonterminalen ausgelöst wird, was die Hypothese unterstützt, dass es sich hierbei um eine synaptisch ausgelöste Apoptose handelt (Mattson et al., 1998), die zu einer verzögerten Degeneration der Zellkörper führt. Interessanterweise konnte nach der direkten Infusion von 6-OHDA in die SNC der Ratte weder akut, noch in einem Zeitraum von 60 Tagen morphologische Anzeichen von Apoptose nachgewiesen werden (Jeon et al., 1995). Dies unterstreicht die Natur des retrograden Läsionsmodell als Modell einer neuronalen Axotomie, bei der zunächst die synaptischen Kontakte verloren gehen und erst verzögert die Zellkörper, höchstwahrscheinlich apoptotisch, degenerieren. Welche Implikation dieser verzögerte Zelltod nach Axotomie für die pathologischen Prozesse bei der Parkinson-Krankheit hat bleibt fraglich, auch wenn aktivierte Caspase-3 in der SNC von Parkinson Patienten nachgewiesen wurde (Hartmann et al., 2000). Sollte die Aktivierung von Caspase-3 auch bei der progressiven Degeneration der SNC in der Parkinson-Krankheit eine entscheidende Rolle spielen, ist das Tiermodell der retrograden striatonigralen Degeneration von konstruktiver Validität und macht es besonders geeignet, die Effekte protektiver Massnahmen zu untersuchen.

Unter diesem Aspekt können die vorliegenden Beobachtungen keinen Einfluss der NR2B-vermittelten GLUergen Transmission auf die apoptotischen Prozesse in der SNC zeigen. Qualitativ bestehen keine Unterschiede in der zellulären Lokalisation des aktiven p20

Fragments der Caspase-3, der Verminderung der TH IR und der apoptotischen Zellkerne in TH-negativen Neuronen nach der chronischen Behandlung mit CP-101,606 im Vergleich zur 6-OHDA-Läsion. Bereits diskutierte Verteilung der NMDA-Rezeptor Subtypen im ventralen Mesencephalon kann diesen Befund erklären. Für die postulierte GLUerge Überaktivität nach DAerger Denervation würde dies bedeuten, dass sie wahrscheinlich über die NR1/NR2D/NR2C-Subtypen des NMDA-Rezeptors, die in der SNC prominent exprimiert werden (Standaert et al., 1994) oder auch vorhandene AMPA-Rezeptoren (Albers et al., 1999; Yung, 1998) die beobachteten apoptotischen Prozesse beeinflusst oder sogar antreibt.

In diesem Zusammenhang erscheint es zunächst verwunderlich, dass die Expression von c-Fos und c-Jun in der SNC nach Ende der chronischen Behandlung mit CP-101,606 zunimmt. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass CP-101,606 die erhöhte Expression von c-fos mRNA im Hippokampus nach akuter Injektion von NMDA reduziert (Menniti et al., 2000). Da die Tiere in vorliegendem Experiment erst 24 h nach Entleerung der Pumpen perfundiert wurden, ist davon auszugehen, dass der Plasmaspiegel von CP-101,606 gemäss einer Halbwertszeit von 1 h (Menniti et al., 2000) zum Zeitpunkt der Perfusion vollständig abgesunken war. Somit wäre die Blockade der wenigen NR1/NR2B NMDA-Rezeptoren in der SNC aufgehoben, und die so erhöhte GLUerge Transmission kann eine Induktion von c-Fos und c-Jun in der SNC bewirken. Dies würde einem ‚rebound‘ Effekt entsprechen, der zumindest für die c-Fos Induktion dosisabhängig erscheint und der im intakten Tier ebenfalls eine erhöhte Expression von c-Jun induziert. Somit können diese Beobachtungen zeigen, dass die NR1/NR2B-vermittelte GLUerge Transmission auf Neurone der SNC wahrscheinlich effektiv über 3 Wochen blockiert war, dieser Beitrag zur Hemmung der GLUergen Überaktivität jedoch keine protektiven Effekte auf die retrograde striatonigrale Degeneration hat.

Veränderung der striatalen neuronalen Aktivität nach chronischer NR2B-Blockade

Die immunhistochemische Bewertung der striatalen Expression der iTFs c-Fos, FosB und c-Jun zeigt regionspezifisch differenzielle Effekte der chronischen Behandlung mit CP-101,606 auf die basale bzw. 6-OHDA-assoziierte Expression der iTFs. Derzeit liegt nur eine Studie vor, die die Effekte einer NR2B-selektiven Inhibition des NMDA-Rezeptors auf die DA D1-Rezeptor-induzierte Expression von c-Fos im dorsalen CPu der intakten Ratte untersucht hat (Keefe und Ganguly, 1998). Hier wurde gezeigt, dass Ifenprodil akut die SKF 82958-induzierte Expression von c-Fos im lateralen als auch im medialen CPu potenziert. Im Gegensatz dazu, blockierten kompetitive und nicht-kompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonisten die c-Fos Expression in beiden Subregionen des CPu (Keefe und Ganguly, 1998). Dies zeigt zunächst, dass eine eher unspezifische Blockade von NMDA-Rezeptoren die DA D1-induzierte iTF Expression hemmt, wie es auch nach der funktionellen Neuroanatomie zu erwarten war, jedoch nicht die NR2B-selektive Blockade über die Polyaminbindungsstelle. Entsprechende Kontrollexperimente in dieser Studie schliessen eine direkte Stimulation von c-Fos durch Ifenprodil aus (Keefe und Ganguly, 1998), daher muss hier von komplexeren Interaktion zwischen DAerger und NR2B-SU-vermittelter GLUerger Transmission ausgegangen werden.

Im vorliegenden Experiment wird im DA-denervierten Tier eine erhöhte Expression von c-Fos im Anschluss an die chronische Behandlung mit CP-101,606 nachgewiesen, wobei die DA-Denervation selbst keine anhaltende Expression von c-Fos in den untersuchten

Subregionen des dorsalen und ventralen Striatums induziert. Diese Beobachtung unterstützt die vorangegangenen Befunde (siehe 4. und 5.) nicht und muss konsequenterweise dadurch erklärt werden, dass die striatonigrale Degeneration zu diesem Zeitpunkt bereits weitestgehend abgeschlossen war und somit keine dynamische Veränderung der Transmitterbalance vorliegt, die eine anhaltende Induktion von c-Fos bedingt. Die Zunahme der c-Fos Expression nach Ende der CP-Behandlung deutet, wie für die SNC bereits diskutiert, auf einen ‚rebound‘ Effekt hin. Die chronisch inhibierte GLUerge Überaktivität nach DAerger Denervation wird in Folge der absinkenden Plasmaspiegel des Antagonisten ‚gebahnt‘ und induziert akut die Expression von c-Fos. Da dies von der DA-Denervation abhängig ist (Abb. 54A), wird damit die postulierte GLUerge Überaktivität der kortikostriatalen Projektion bestätigt. Die Regionspezifität für das laterale CPu lässt sich jedoch nicht auf die Verteilung der NR2B-SU im CPu zurückführen. Neuroanatomische Studien in der Ratte und auch beim Menschen haben gezeigt, dass die NR2B-SU gleichmässig über das dorsale CPu verteilt ist (Chen et al., 1996; Counihan et al., 1998; Standaert et al., 1994; Watanabe et al., 1993), und dass sowohl striatopallidale als auch striatonigrale Projektionsneurone die NR2B-SU prominent exprimieren (Chen et al., 1996; Küppenbender et al., 2000). Das regionspezifische Expressionsmuster kann daher nur über die kortikostriatale GLUerge Innervation erklärt werden, die im lateralen CPu besonders prominent ist (Donoghue und Herkenham, 1986; Gerfen, 1984; Kincaid und Wilson, 1996) (siehe auch 5.5.) und daher auch hier die ausgeprägteste GLUerge Überaktivität zu erwarten ist, die dann nach fehlender Hemmung durch CP-101,606 die akute Induktion von c-Fos in striatalen Neuronen antreibt. Ein ähnlicher Effekt wird im Acbc beobachtet, in dem die NR2B-SU ebenfalls prominent exprimiert wird (Standaert et al., 1994) und demnach die kortikale GLUerge Projektion nach Abnahme der NR2B-selektiven Inhibition gebahnt wird. Ein ‚rebound‘ Effekt kann auch die Zunahme der c-Jun Expression im Anschluss an die CP-Behandlung erklären, die im Gegensatz zu c-Fos im medialen CPu nach DAerger Denervation beobachtet wird. Auch hier induziert die DA-Denervation selbst nur eine geringe Zunahme der c-Jun Expression, was ebenfalls darauf hindeutet, dass sich die postulierte Transmitterimbalance zu diesem Zeitpunkt nicht mehr weiter verändert. Warum der ‚rebound‘ Effekt auf die c-Jun Induktion regionspezifisch für das mediale CPu ist, kann wiederum nur über das Zusammenspiel der topographische DArgen Innervation aus dem ventralen Mesencephalon (Björklund und Lindvall, 1984) bzw. deren Verlust und der topographischen GLUergen Innervation aus neo-, meso- und allokortikalen Regionen (McGeorge und Faull, 1989) erklärt werden. Neueste Untersuchungen zu den elektrophysiologischen Eigenschaften striataler NMDA-Rezeptoren mittels patch clamp Ableitungen zeigten, dass die langsame Komponente der postsynaptischen Antwort in Neuronen des medialen CPu grösser ist, als die im lateralen CPu (Chapman et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass im lateralen CPu mehr NR2A-SUs exprimiert werden als im medialen CPu (Standaert et al., 1994; Watanabe et al., 1993), was zu der Überlegung führte, dass sich die NMDA-Rezeptor Heterooligomere lateral aus einer NR1 SU, einer NR2B SU und 2 NR2A SUs zusammensetzen, medial dagegen aus einer NR1 SU, 2 NR2B SUs und einer NR2A SU (Chapman et al., 2000). Dies würde folglich erklären, warum striatale NMDA-Rezeptoren unterschiedlich auf exzitatorische Afferenzen reagieren, und ebenfalls die hier beobachtete selektive Induktion der iTFs c-Fos und c-Jun, die demnach differenziell

nach postsynaptischer Rezeptorstimulationen induzierte werden und in Folge auch unterschiedlich die neuronale Funktion der Neurone regulieren.

Sowohl die DA-Denervation, als auch die chronische Behandlung mit CP-101,606 führen zu einer anhaltenden Expression von FosB Proteinen, die u.a. FosB und Δ FosB beinhalten. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die FosB Proteine anhaltend nach einmaliger oder chronischer Stimulation von DA- und auch NMDA-Rezeptoren exprimiert vorliegen (Hollen et al., 1997; Hope et al., 1992, Zusammenfassung in Nestler et al., 1999; O'Callaghan et al., 2000). Daher kann die 6-OHDA-bedingte Zunahme der FosB Proteine insbesondere im medialen CPU auf die postulierte GLUerge Überaktivität zurückgeführt werden. Die NR2B-selektive Inhibition der NMDA-Rezeptoren kann diese Veränderung der neuronalen Funktion nicht beeinflussen, und muss dahingehend interpretiert werden, dass die Balance zwischen DAerger und GLUerger Transmission auf Ebene striataler Projektionsneurone nicht wiederhergestellt werden kann. Dies mag in diesem Fall durch die bereits diskutierte Veränderung der Subtypen-Zusammensetzung der striatalen NMDA-Rezeptoren nach DAerger Denervation erklärt werden (Dunah et al., 2000), wodurch der NR2B-selektive Antagonist nur noch eine verminderte Anzahl an Bindungsstellen inhibieren kann, um die überaktive kortikostriatale Projektion an striatalen Neuronen zu blockieren. Im Gegensatz dazu kann in beiden Subregionen des Acb die chronische NR2B-selektive NMDA-Rezeptor-Inhibition die Expression von FosB Proteine unter die basale Expression reduzieren. Da der Acb von der DAergen Denervation nur geringfügig betroffen ist, ist zu vermuten, dass auch hier keine Veränderung der Subtypen-Zusammensetzung induziert wird. Folglich reduziert die NR2B-selektive Inhibition die neuronale Aktivität accumbaler Neurone die offensichtlich normalerweise entscheidend durch die GLUergen kortikoaccumbalen Projektion bestimmt wird. Verhaltenspharmakologische, elektrophysiologische und auch neuroanatomische Studien belegen die Relevanz der kortikalen GLUergen Innervation des Acb für dessen Funktion (Burns et al., 1994; Hauber et al., 2000; Li et al., 1999). Dabei scheint die GLUerge Projektion aus dem mPFC bei der Regulation der zellulären neuroadaptiven Prozessen eine entscheidende zu spielen (Li et al., 1999), auch wenn die neuronale Aktivität der Acb Neurone gemessen an ihrer elektrophysiologischen Aktivität *in vivo* hauptsächlich durch nicht-NMDA-Rezeptoren bestimmt wird (Hu und White, 1996). Trotzdem können langfristige funktionelle Veränderungen wie eine Dysregulation der Neuropeptid mRNA von PPT und PPE durch die Blockade der NMDA-Rezeptor vermittelten GLUergen Transmission im Acb ausgelöst werden (Angulo et al., 1995), was mit der hier beobachteten veränderten neuronalen Aktivität im Einklang steht.

Zusammengenommen können die hier vorliegenden Befunde die Hypothese, dass eine chronische NR2B-selektive Inhibition der überaktiven GLUergen Transmission zu einer Normalisierung der neuronalen Aktivität und Funktion striataler Neurone nach DAerger Denervation führt, nicht unterstützen. Obwohl das Striatum aufgrund seiner breiten und ausgeprägten Verteilung des NR2B-Subtyps der NMDA-Rezeptoren eine geeignete Zielstruktur zur selektiven, aktivitäts-abhängigen Inhibition der überaktiven kortikostriatalen GLUergen Transmission darstellt, vermag der NR2B-selektive Antagonist CP-101,606 die chronische Veränderung neuronaler Funktion nicht zu beeinflussen.

Regionspezifische Funktionsveränderungen im Zusammenhang zur ‚extranigralen‘ Pathologie nach chronischer NR2B-Blockade

Die Untersuchung zur Wirkung einer chronischen NR2B-selektiven Blockade der GLUergen Transmission mit CP-101,606 auf die veränderte neuronale Aktivität in ‚extranigralen‘ Strukturen nach DAerger Denervation zeigt regionspezifische differentielle Effekte, die auch hier hauptsächlich mit einem ‚rebound‘ Effekt erklärt werden können. Die neuroanatomische Grundlage für diesen Effekt bildet die breite Verteilung der NR1/NR2B-Subtypen des NMDA-Rezeptors in den untersuchten Strukturen (Standaert et al., 1994; Watanabe et al., 1993).

Kerne der dorsalen und ventralen Basalganglien Schleife

Die im Anschluss an die Behandlung mit CP-101,606 erhöhten Expressionen von c-Fos und c-Jun in der SNR, dem MGP, dem PPTg und dem VP zeigt sich ähnlich wie im dorsalen CPu, wobei auch hier keine anhaltende Induktion dieser beiden iTFs nach DAerger Denervation beobachtet wird. Im MGP und der SNR wird die NR2B SU zusammen mit der NR1 SU exprimiert, wenn auch in geringerem Ausmass als im CPu (Standaert et al., 1994; Watanabe et al., 1993), so dass hier von einer postsynaptischen Lokalisation der funktioneller NR1/NR2B-Subtyp NMDA-Rezeptoren auszugehen ist. Die prominente Induktion von c-Fos und c-Jun, insbesondere in den Ausgangstrukturen der dorsalen Schleife spricht dafür, dass hier eine GLUerge Transmission ‚gebahnt‘ wird, im Sinne der postulierten überaktiven GLUergen subthalamischen Projektion in die SNR und den MGP. Da bisher keine Studie vorliegt, die eine NR2B-SU Verteilung im PPTg oder VP zeigt, muss über einen Effekt wie in der SNR und dem MGP spekuliert werden.

‚Extended Amygdala‘ und Nuclei Septi

Ähnlich wie in den Kernen der motorischen Basalganglien Schleife induziert eine nachlassende NR2B-selektive Inhibition der NMDA-Rezeptor-vermittelten GLUergen Transmission eine Induktion der transienten iTFs c-Fos und c-Jun im BST und dem Ce. Auch hier ist die NR2B-SU moderat bis hoch exprimiert (Standaert et al., 1994; Watanabe et al., 1993) und ist damit Teil der postsynaptischen NMDA-Rezeptor-Formation in der EA, was durch ultrastrukturelle Untersuchungen gezeigt wurde (Farb et al., 1995; Gracy und Pickel, 1995). Da die Kerne der EA sowohl durch kortikale als auch intrinsische reziproke Afferenzen extensiv GLUerg kontrolliert werden (Zusammenfassung in Alheid und Heimer, 1988) deuten die hier erhobenen Daten wiederum auf einen akuten ‚rebound‘ Effekt der Behandlung mit CP-101,606 hin, wobei es zu keinen anhaltenden Veränderungen der neuronalen Aktivitäten nach DAerger Denervation kommt.

Eine chronische Inhibition der neuronalen Funktion, nachgewiesen als reduzierte Expression von FosB Proteinen wird im BSTM und dem MS im Anschluss an die Behandlung mit CP-101,606 beobachtet. Hier zeigt sich, ähnlich wie im Acb, dass die NR2B-selektive Inhibition der GLUergen Transmission die neuronale Aktivität langfristig vermindern kann.

Zusammengenommen wird hier zum erstenmal gezeigt, dass auch in den ‚extranigralen‘ Strukturen der dorsalen und ventralen Basalganglien Schleife, sowie den assoziierten Kernen der EA die neuronale Aktivität und Funktion durch die NR2B-SU des NMDA-Rezeptors reguliert wird. Auch wenn der beobachtete ‚rebound‘ Effekt keine eindeutige Aussage darüber zulässt, ob die NR2B-selektive Blockade die postulierte Transmitterimbalance wiederherstellen kann, machen die hier erhobenen Befunde deutlich, dass eine anti-GLUerge

Behandlung mit diesen selektiven Substanzen die neuronale Aktivität in ‚extranigralen‘ Regionen akut und chronisch beeinflussen kann und folglich auch die pathologisch adaptativen Prozesse, die der ‚extranigralen Pathologie‘ zugrunde liegen, unterbinden kann.

Zusammenfassung

Im Tiermodell der partiellen bilateralen striatonigralen Läsion wird gezeigt, dass eine chronische NR2B-selektive Inhibition des NMDA-Rezeptors mit dem Antagonisten CP-101,606 keine antiparkinsonoide Wirkung hat. Ebenso wenig kann eine neuroprotektive Wirkung auf die progressive Degeneration der SNC Neurone und die DAerge Innervation des Vorderhirns durch eine frühe NR2B-selektive Blockade der GLUergen Überaktivität erzielt werden. Unter der Annahme dass sowohl den Verhaltensdefiziten, als auch der Neurodegeneration ein ‚sekundär‘ überaktives GLUerges System zugrunde liegt, muss aus den vorliegenden Beobachtungen geschlossen werden, dass die ‚aktivitäts-abhängige‘ Inhibition der NMDA-Rezeptor-vermittelten GLUergen Transmission nicht ausreicht, das Transmittergleichgewicht in den Basalganglien wiederherzustellen. Die hier charakterisierten apoptotischen Prozesse, die in der SNC durch die retrograde Degeneration ausgelöst werden, bleiben unbeeinflusst von der NR2B-selektiven Blockade des GLUergen Systems, und werden wahrscheinlich, sofern sie Teil der postulierten langsamen Exzitotoxizität sind, durch andere NMDA-Rezeptor-Subtypen oder AMPA-Rezeptoren angetrieben. Auch wenn die NR2B-selektive Inhibition der GLUergen Überaktivität zu keiner Wiederherstellung der Transmitterbalance in den Kernen der Basalganglien und eng assoziierten limbischen Strukturen führt, wird die neuronale Aktivität und Funktion regionspezifisch durch die NR2B-Subtypen der NMDA-Rezeptoren beeinflusst. Dies weist zumindest auf die Möglichkeit in, dass die NR2B-selektive Inhibition des GLUergen Systems protektive Einflüsse auf die Prozesse der ‚extranigralen‘ Pathologie haben kann.

7. Allgemeine Diskussion und Schlussfolgerung

Durch die bilaterale intrastriatale Infusion des Neurotoxins 6-OHDA wird eine partielle retrograde striatonigrale Degeneration ausgelöst, die sich in Verhaltensdefiziten sowie einem progressiven Verlust DAerger Neurone im ventralen Mesencephalon und einer korrespondierenden Abnahme der DAergen Innervation des Vorderhirns nachweisen lässt. Eine mittelschwere DA-Denervation ist ausreichend um eine Störung in der Bewegungsinitiation und Rigor, ermittelt im Katalepsie-Test, sowie eine Abnahme der Spontanaktivität in den Versuchstieren auszulösen; die Zunahme der Verhaltensdefizite über 4 – 8 Wochen spiegelt die Progredienz der Degeneration wieder. Die Subtilität der Verhaltensdefizite, die sich nur in den entsprechenden Verhaltenstests äussern, und das Ausmass der Degeneration weisen eine Übereinstimmung mit einem präklinischen bis frühen klinischen Stadium der Parkinson-Krankheit auf, weshalb das vorliegende Modellsystem sowohl eine konstruktive (Degenerationsmuster) und ‚face‘ (Verhaltensdefizite) Validität für die frühe Parkinson-Krankheit besitzt. Auch die genauere Charakterisierung der pathologischen Prozesse, die zur Degeneration der DAergen Neurone führen, macht die Vergleichbarkeit deutlich. Sowohl nach 4 als auch nach 8 Wochen sind pathomorphologischen Veränderungen wie Zell- und Kerndegradation, sowie ein Funktionsverlust nachzuweisen. Zusammen mit der Aktivierung von Caspase-3 und der anschliessenden DNA-Fragmentation deutet dies auf die Beteiligung des apoptotischen Zelltods bei der 6-OHDA-induzierten retrograden Degeneration hin. Da auch bei der Parkinson-Krankheit zu einem gewissen Ausmass langsame apoptotische Prozesse selbst zu späten Stadien der Erkrankung beobachtet werden (Hartmann et al., 2000, Zusammenfassung in Dunnett und Björklund, 1999) unterstreicht dies zusätzlich die Vergleichbarkeit der Systeme. Darüberhinaus ermöglicht diese Beobachtung den Schluss, dass es auch bei der Parkinson-Krankheit möglicherweise zunächst zu einer Degeneration der synaptischen Kontakte im Bereich der striatalen Axonterminalen kommt, und diese ‚Axotomie‘ den postulierten Prozess der ‚synaptischen Apoptose‘ (Mattson et al., 1998) auslöst und schliesslich die Degeneration der Zellkörper in Gang setzt. Diese Überlegung ist nach wie vor besonders attraktiv, um die selektive Vulnerabilität (Hirsch et al., 1988; Jellinger, 1991) der nigrostriatalen Projektionsneurone für die primäre Degeneration zu erklären (Pedersen und Schmidt, 2000a). Vorliegende Arbeit kann unterstützen, dass möglicherweise im Striatum der DAerge Metabolismus und die DA-Freisetzung ursächlich an der Degeneration der SNC Neurone beteiligt ist (Hastings et al., 1996; Olanow et al., 1998).

‚Extranigrale‘ degenerative Prozesse in kortikalen und subkortikalen Strukturen sind Teil der neuropathologischen Veränderungen der Parkinson-Krankheit (Braak et al., 1996; Braak und Braak, 2000; Hirsch et al., 1987; Jellinger, 1991) und tragen zur komplexen Symptomatologie bei (Braak et al., 1996; Obeso et al., 2000b). Die partielle bilaterale striatonigrale Degeneration kann Veränderungen neuronaler Aktivität und Funktion in distalen Gehirnregionen auslösen, die nicht unmittelbar von der Degeneration der SNC Neurone betroffen sind (z.B. die Eingangsstrukturen der Basalganglien). Da diese distalen Strukturen, wie der PPTg oder die Kerne der EA auch bei der Parkinson-Krankheit besonders vulnerable für die ‚extranigrale Pathologie‘ sind, hat das hier charakterisierte

Tiermodell nicht nur eine konstruktive Validität hinsichtlich der primären ‚nigralen Pathologie‘, sondern stellt darüberhinaus auch ein ‚cross species‘ Modell für die sekundären degenerativen Vorgänge der Parkinson-Krankheit dar. Die funktionelle Neuroanatomie zeigt, dass in einigen dieser Strukturen eine enge Interaktion zwischen DAerger und GLUerger Transmission besteht und demnach in Folge der progressiven DA-Denervation eine funktionelle GLU-Überaktivität entsteht, die gemäss der Hypothese die sekundäre ‚extranigrale‘ Pathologie antreiben kann. Vorliegende Arbeit charakterisiert diese möglichen Zusammenhänge zum erstenmal in einem klinisch relevanten Tiermodell und ermöglicht nun die Wirkung therapeutischer Massnahmen auf die primären und sekundären neurodegenerative Vorgänge zu einem frühen Stadium der Erkrankung zu untersuchen.

Basierend auf der Theorie, dass die Verminderung des DAergen Tonus eine sekundäre GLUerge Überaktivität bedingt, die das Netzwerk der Basalganglien in ein ‚zerstörerisches Netzwerk‘ verwandelt (Pedersen und Schmidt, 2000a), bietet sowohl die DA-Substitution, als auch die selektive Inhibition der überaktiven GLU-Transmission die Möglichkeit, normalisierend auf die Transmitterbalance einzuwirken. Hier wird gezeigt, dass nur die chronische kontinuierliche DA-Substitution zu einem gewissen Ausmass den physiologischen DA-Tonus nach DAerger Denervation wiederherstellen kann und die - anhand der Basalganglien Anatomie- postulierten veränderten neuronalen Aktivitäten in den Basalganglien und assoziierten Strukturen normalisiert (Abb. 55) Es bleibt zu klären ob die Wiederherstellung des striatofugalen Projektionssystem dafür verantwortlich ist, oder ob die jeweiligen Strukturen selbst eine Restoration des DA-Tonus erfahren. Darüberhinaus kann eine kontinuierliche Stimulation von DA D2-Autorezeptoren auf SNC Neuronen den ‚protektiven‘ Effekt erklären, den die chronische Behandlung mit Cabergolin ausübt, allerdings lässt der Funktionsverlust der so geschützten Neurone nicht den Schluss zu, dass der DA-Rezeptor-Agonist funktionell neuropotektiv ist. Wahrscheinlich sind für die vollständige funktionelle Restoration der SNC Neurone weitere stimulierende Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder aber auch die korrekte Reorganisation synaptischer Konnektivitäten notwendig um dem Neuron ‚Funktionalität‘ zu signalisieren. Daher kann dieser Befund und der daraus gezogen Schluss die aktuelle Diskussion über das neuroprotektive Potential von DA-Rezeptor-Agonisten bei der Parkinson-Krankheit nicht eindeutig unterstützen, zumal sich diese Überlegungen (Olanow et al., 1998) in erster Linie auf *in vitro* Studien stützt, *in vivo* aber wahrscheinlich vielfältigere und komplexere Mechanismen Neuroprotektion vermitteln.

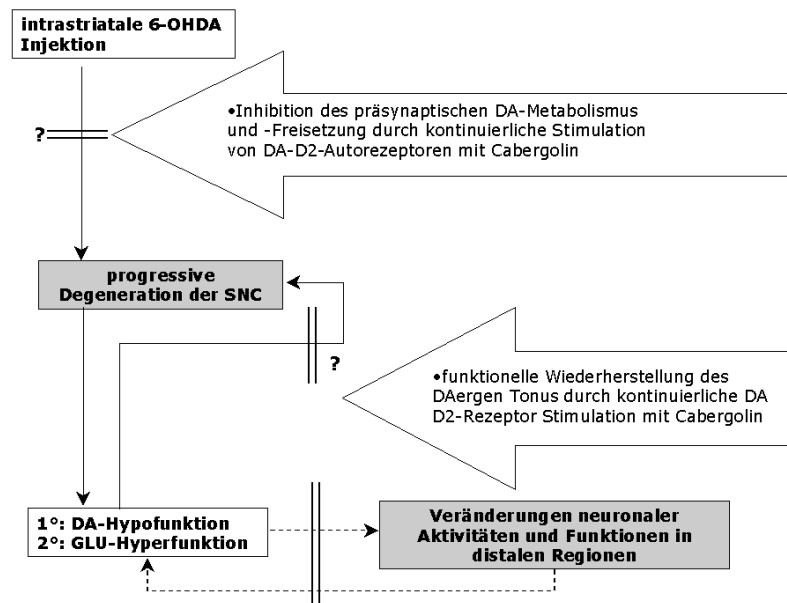


Abb. 55: Zusammenfassung der Wirkung einer chronischen DA-Substitution auf die neurodegenerative Kaskade der ‚zerstörerischen Netzwerke‘. Die chronische Stimulation präsynaptischer DA D2-Autorezeptoren ist möglicherweise für einen geringen protektiven Effekt der Behandlung mit Cabergolin verantwortlich, in dem die DA-Synthese und -Freisetzung im somatodendritischen und axonalen Bereich vermindert wird. Die Inhibition der TH Expression macht jedoch fraglich, ob die so funktionslosen Neurone langfristig überleben. Eindeutig gezeigt werden konnte jedoch, dass die funktionelle Wiederherstellung des DA-Tonus die neuronalen Aktivitäten und Funktionen im Striatum aber auch in distalen Regionen normalisiert und somit möglicherweise die Kaskade des ‚zerstörerischen Netzwerkes‘ unterbrechen kann. DA, Dopamin, 6-OHDA, 6-Hydroxydopamin (nach Pedersen und Schmidt, 2000a).

Die frühe chronische kontinuierliche Stimulation von DA D2-Rezeptoren mit langwirksamen Agonisten ist Bestandteil der derzeitigen Diskussion über die geeignetste Therapestrategie bei der Parkinson-Krankheit (Olanow et al., 2000). Dem Verhaltensphänomen der LIDs bei der Parkinson-Krankheit wird ein LTP-ähnlicher Lernprozess zugrunde gelegt (Calabresi et al., 2000b) mit entsprechenden plastischen Veränderungen neuronaler Funktionen der striatalen Projektionsneurone (Calon et al., 2000b), die wahrscheinlich ausgelöst wird durch eine unphysiologische pulsatile Stimulation striataler DA-Rezeptoren (Chase und Oh, 2000b). Die vorliegende Arbeit kann zeigen, dass die kontinuierliche DA-Substitution mit dem langwirksamen DA D2-Rezeptor-Agonisten Cabergolin adaptative Prozesse, wie eine anhaltend veränderte Expression von iTFs insbesondere im Striatum nach DA-Denervation und wiederholter DAerger Stimulation inhibieren kann und parallel dazu keine Sensitivierung der motorischen Verhaltensantwort bewirkt, was im Gegensatz dazu nach der pulsatilen DA-Substitution mit Lisurid beobachtet wird. Da das Phänomen der LID wahrscheinlich ebenfalls als Sensitivierung der Verhaltensantwort anzusehen ist (Schmidt et al., 1999) kann hier gezeigt werden, dass auch das Modell der partiellen bilateralen DAergen Denervation geeignet ist, eine Aussage über das dyskinetische Potential einer DAergen Therapie zu machen und daher über eine prädiktive Validität gegenüber den Effekten einer Behandlung mit DA-Rezeptor-Agonisten verfügt. Aus vergleichbaren Untersuchungen am MPTP-behandelten Affen wurde ebenfalls der Schluss gezogen, dass eine bilaterale subtotale Läsion grössere prädiktive Validität für die Pathophysiologie der LIDs besitzt als entsprechende unilaterale Läsionen (Andringa et al., 1999a; Andringa et al., 1999b). In Übereinstimmung damit kann aus vorliegender Arbeit gefolgert werden, dass nicht nur die ‚extranigrale Pathologie‘ der Parkinson-Krankheit mit der partiellen bilateralen

striatonigralen Degeneration in der Ratte simuliert werden kann, sondern darüberhinaus auch pathophysiologische Adaptationen, die für die klinische Effizienz und Sicherheit DAerger Therapien relevant sind.

Da das GLUerge System bei der Parkinson-Krankheit nicht degeneriert, und wahrscheinlich seine Sensitivität und kompensatorische Fähigkeit beibehält (Schmidt und Kretschmer, 1997) verspricht die anti-GLUerge Therapie einen alternativen Ansatz zur symptomatischen Behandlung durch die Unterstützung der L-DOPA Therapie (Zusammenfassungen in Blandini et al., 2000a; Schmidt und Kretschmer, 1997) und zur Verminderung oder Vermeidung der LIDs (Chase et al., 2000; Chase und Oh, 2000b). Weiterhin mag aber auch die Inhibition der langsamen ‚energie-gebundenen‘ Exzitotoxizität die Progression der ‚nigralen‘ und ‚extranigralen‘ Degenerationen aufhalten (Pedersen und Schmidt, 2000a). Diese Annahme kann durch vorliegende Arbeit insofern nicht gestützt werden, dass die NR2B-selektive Inhibition der NMDA-Rezeptor-vermittelten GLU-Transmission weder antiparkinsonoide noch neuroprotektive Wirkung auf die Degeneration der SNC hat. Die ausbleibenden Effekte können durch Veränderungen der Subtypenkomposition der NMDA-Rezeptoren auf striatalen Neuronen nach DA-Denervation bzw. mangelnde Expression der NR2B-SU auf Neuronen der SNC erklärt werden. Konsequenterweise schränkt es aber auch das neuroprotektive und antiparkinsonoide Potential dieser Substanzklasse bei der Parkinson-Krankheit ein. Da derzeit keine weiteren vergleichbaren Untersuchungen zur Neuroprotektion mit den NR2B-selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ifenprodil und CP-101,606 in Tiermodellen der Parkinson-Krankheit vorliegen kann auf ein mangelndes neuroprotektives Potential nicht endgültig geschlossen werden, weitere tierexperimentelle Studien sind hierfür nötig. Da die NR2B-selektive Blockade im Striatum durchaus Auswirkung auf die kortikostriatale GLU-Projektion und die neuronale Funktion striataler Neurone hat, besteht die Möglichkeit, trotz ausbleibender direkter antiparkinsonoider Wirkung, dass diese Form der anti-GLUerge Therapie mit NR2B-selektiven Antagonisten zur Verbesserung der LIDs bei der Parkinson-Krankheit beitragen kann, entsprechende Studien sollten durchgeführt werden. Ebenso kann regionspezifisch die neuronale Funktion in ‚extranigralen‘ Strukturen beeinflusst werden. Dies zeigt die Möglichkeit auf, dass die verheerende ‚extranigrale‘ Degeneration der motorischen und kognitiven Systeme bei der Parkinson-Krankheit durch NR2B-selektive NMDA-Rezeptor-Antagonisten verzögert werden kann. Aufgrund ihres erwiesenen günstigen Nebenwirkungsprofils (Zusammenfassung in Chenard und Menniti, 1999), bestätigt in vorliegender Untersuchung im DA-denervierten Tier, sollte die Substanzklasse der NR2B-selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten weiterhin in Tiermodellen der Parkinson-Krankheit untersucht werden um die Relevanz der NR2B-vermittelten GLU-Transmission für die Erkrankung genauer zu charakterisieren.

8. Literaturverzeichnis

- Adams SL, Foldes RL, Kamboj RK (1995) Human N-methyl-D-aspartate receptor modulatory subunit hNR3: cloning and sequencing of the cDNA and primary structure of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1260: 105-108.
- Agid Y, Barroche G, Bonnet AM, Javoy AF, Kato G, Lhermitte F, Pollak P, Signoret JL (1979) Dopamine receptor stimulating agonists in the treatment of Parkinson's disease. *Biomedicine* 30: 67-71.
- Aizman O, Brismar H, Uhlen P, Zettergren E, Levey AI, Forssberg H, Greengard P, Aperia A (2000) Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* 3: 226-230.
- Albers DS, Weiss SW, Iadarola MJ, Standaert DG (1999) Immunohistochemical localization of N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor subunits in the substantia nigra pars compacta of the rat. *Neuroscience* 89: 209-220.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12: 366-375.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9: 357-381.
- Alheid GF, de Olmos JS, Beltramino CA (1995) Amygdala and extended amygdala. In: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed), pp 495-578. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.
- Alheid GF, Heimer L (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27: 1-39.
- Amalric M, Koob GF (1987) Depletion of dopamine in the caudate nucleus but not in nucleus accumbens impairs reaction-time performance in rats. *J Neurosci* 7: 2129-2134.
- Amalric M, Moukhles H, Nieoullon A, Daszuta A (1995) Complex deficits on reaction time performance following bilateral intrastriatal 6-OHDA infusion in the rat. *Eur J Neurosci* 7: 972-980.
- Anderson AJ, Su JH, Cotman CW (1996) DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. *J Neurosci* 16: 1710-1719.
- Andersson M, Hilbertson A, Cenci MA (1999) Striatal fosB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 6: 461-474.
- Andrés ME, Gysling K, Araneda S, Venegas A, Bustos G (1996) NMDA-NR1 receptor subunit mRNA expression in rat brain after 6-OH- dopamine induced lesions: a non-isotopic in situ hybridization study. *J Neurosci Res* 46: 375-384.
- Andringa G, Lubbers L, Drukarch B, Stoof JC, Cools AR (1999b) The predictive validity of the drug-naive bilaterally MPTP-treated monkey as a model of Parkinson's disease: effects of L-DOPA and the D1 agonist SKF82958. *Behav Pharmacol* 10: 175-182.
- Andringa G, Vermeulen RJ, Drukarch B, Renier WO, Stoof JC, Cools AR (1999a) The validity of the pretreated, unilaterally MPTP-treated monkey as a model of Parkinson's disease: a detailed behavioural analysis of the therapeutic and undesired effects of the D2 agonist quinpirole and the D1 agonist SKF81297. *Behav Pharmacol* 10: 163-173.
- Anglade P, Vyas S, Hirsch EC, Agid Y (1997b) Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histol Histopathol* 12: 603-610.

- Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero M-T, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y (1997a) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 12: 25-31.
- Angulo JA, Williams A, Ledoux M, Watanabe Y, McEwen BS (1995) Elevation of striatal and accumbal preproenkephalin, preprotachykinin and preprodynorphin mRNA abundance subsequent to N-methyl-D-aspartate receptor blockade with MK-801. *Mol Brain Res* 29: 15-22.
- Arai N, Isaji M, Kojima M, Mizuta E, Kuno S (1996) Combined effects of cabergoline and L-DOPA on parkinsonism in MPTP-treated cynomolgus monkeys. *J Neural Transm* 103: 1307-1316.
- Araki T, Tanji H, Kato H, Imai Y, Mizugaki M, Itoyama Y (2000) Temporal changes of dopaminergic and glutamatergic receptors in 6-hydroxydopamine-treated rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 10: 365-375.
- Aronin N, Chase K, Sagar SM, Sharp FR, DiFiglia M (1991) N-methyl-D-aspartate receptor activation in the neostriatum increases c-fos and fos-related antigens selectively in medium-sized neurons. *Neuroscience* 44: 409-420.
- Asanuma M, Ogawa N, Nishibayashi S, Kawai M, Kondo Y, Iwata E (1995) Protective effects of pergolide on dopamine levels in the 6-hydroxydopamine-lesioned mouse brain. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 329: 221-230.
- Aston-Jones G, Shipley MT, Grzanna R (1995) The locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed), pp 183-213. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.
- Atherton JF, McLaughlin KE, Wright AK, Norrie L, Arbuthnott GW (2000) Lesions of the globus pallidus which increase subthalamic nucleus activity cause dopamine cell death. Abstract, Society for Neuroscience 30.
- Aziz TZ, Peggs D, Sambrook MA, Crossman AR (1991) Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. *Mov Disord* 6: 288-292.
- Baas H (2000) Dyskinesia in Parkinson's disease. Pathophysiology and clinical risk factors. *J Neurol [Suppl]* 247: 12-16.
- Batchelor PE, Liberatore GT, Porritt MJ, Donnan GA, Howells DW (2000) Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum. *Eur J Neurosci* 12: 3462-3468.
- Batini C, Guegan M, Palestini M, Thomasset M, Vigot R (1997) Upregulation of Calbindin-D-28k immunoreactivity by excitatory amino acids. *Arch Ital Biol* 135: 385-397.
- Beal MF (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative disease. *Trends Neurosci* 23: 298-304.
- Beart PM, McDonald D, Cincotta M, de Vries DJ, Gundlach AL (1986) Selectivity of some ergot derivatives for 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors of rat cerebral cortex. *Gen Pharmacol* 17: 57-62.
- Beckstead RM, Kersey KS (1985) Immunohistochemical demonstration of differential substance P-, met-enkephalin-, and glutamic-acid-decarboxylase-containing cell body and axon distributions in the corpus striatum of the cat. *J Comp Neurol* 232: 481-498.
- Bedard PJ, Blanchet PJ, Levesque D, Soghomonian JJ, Grondin R, Morissette M, Goulet M, Calon F, Falardeau P, Gomez MB, Doucet JP, Robertson GS, DiPaolo T (1999) Pathophysiology of L-dopa-induced dyskinesias. *Mov Disord [Suppl]* 14: 4-8.
- Bedard PJ, Di Paolo T, Falardeau P, Boucher R (1986) Chronic treatment with L-DOPA, but not bromocriptine induces dyskinesia in MPTP-parkinsonian monkeys. Correlation with [³H]spiperone binding. *Brain Res* 379: 294-299.
- Benazzouz A, Boraud T, Dubedat P, Boireau A, Stutzmann JM, Gross C (1995) Riluzole prevents MPTP-induced parkinsonism in the rhesus monkey: a pilot study. *Eur J Pharmacol* 284: 299-307.

- Benedetti MS, Dostert P, Barone D, Efthymiopulos C, Peretti G, Roncucci R (1990) In vivo interactions of cabergoline with rat brain dopamine receptors labelled with [³H]N-n-propylnorapomorphine. *Eur J Pharmacol* 187: 399-408.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249: 1436-1438.
- Berretta S, Parthasarathy HB, Graybiel AM (1997) Local release of GABAergic inhibition in the motor cortex induces immediate-early gene expression in indirect pathway neurons of the striatum. *J Neurosci* 17: 4752-4763.
- Berretta S, Robertson HA, Graybiel AM (1992) Dopamine and glutamate agonists stimulate neuron-specific expression of c-Fos-like protein in the striatum. *J Neurophysiol* 68: 767-777.
- Berretta S, Sachs Z, Graybiel AM (1999) Cortically driven Fos induction in the striatum is amplified by local dopamine D2-class receptor blockade. *Eur J Neurosci* 11: 4309-4319.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3: 1301-1306.
- Betarbet R, Turner R, Chockkan V, DeLong MR, Allers KA, Walters J, Levey AI, Greenamyre JT (1997) Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J Neurosci* 17: 6761-6768.
- Bezard E, Dovero S, Imbert C, Boraud T, Gross CE (2000) Spontaneous long-term compensatory dopaminergic sprouting in MPTP-treated mice. *Synapse* 38: 363-368.
- Bezard E, Gross CE (1998) Compensatory mechanisms in experimental and human Parkinsonism: towards a dynamic approach. *Prog Neurobiol* 55: 93-116.
- Björklund A, Lindvall O (1984) Dopamine-containing systems in the CNS. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 2: Classical Transmitters in the CNS, Part I. (Björklund A, Hökfelt T, eds), pp 55-121. Elsevier Science Publisher B.V.
- Blanchard V, Anglade P, Dziewczapolski G, Savasta M, Agid Y, Raisman-Vozari R (1996) Dopaminergic sprouting in the rat striatum after partial lesion of the substantia nigra. *Brain Res* 709: 319-325.
- Blanchet PJ (1999) Rationale for use of dopamine agonists in Parkinson's disease: review of ergot derivatives. *Can J Neurol Sci [Suppl]* 26: S21-S26.
- Blandini F, Garcia-Osuna M, Greenamyre JT (1997) Subthalamic ablation reverses changes in basal ganglia oxidative metabolism and motor response to apomorphine induced by nigrostriatal lesion in rats. *Eur J Neurosci* 9: 1407-1413.
- Blandini F, Nappi G, Fancellu R, Greenamyre JT (2000b) Chronic subthalamic infusion of glutamate antagonists in a rodent model of Parkinson's disease. Abstract, Society for Neuroscience 30.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E (2000a) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 62: 63-88.
- Boireau A, Dubedat P, Bordier F, Peny C, Miquet JM, Durand G, Meunier M, Doble A (1994a) Riluzole and experimental parkinsonism: antagonism of MPTP-induced decrease in central dopamine levels in mice. *Neuroreport* 5: 2657-2660.
- Boireau A, Miquet JM, Dubedat P, Meunier M, Doble A (1994b) Riluzole and experimental parkinsonism: partial antagonism of MPP(+)-induced increase in striatal extracellular dopamine in rats in vivo. *Neuroreport* 5: 2157-2160.
- Bozzi Y, Borrelli E (1999) Absence of the dopamine D2 receptor leads to a decreased expression of GDNF and NT-4 mRNAs in restricted brain areas. *Eur J Neurosci* 11: 1275-1284.
- Braak H, Braak E (2000) Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol [Suppl]* 247: 3-10.
- Braak H, Braak E, Yilmazer D, de Vos RAI, Jansen ENH, Bohl J (1996) Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 103: 455-490.

- Braak H, Rüb U, Braak E (2000b) Neuroanatomy of Parkinson's disease. Changes in the neuronal cytoskeleton in only few of the susceptible cell types leads to progressive destruction of affected regions of the limbic and motor systems. *Nervenarzt* 71: 459-469.
- Braak H, Rüb U, Sandmann-Keil D, Gai WP, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Arai K, Braak E (2000a) Parkinson's disease: affection of brain stem nuclei controlling premotor and motor neurons of the somatomotor system. *Acta Neuropathol* 99: 489-495.
- Breese GR, Traylor TD (1971) Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. *Br J Pharmacol* 42: 88-99.
- Brooks DJ (1998) The early diagnosis of Parkinson's disease. *Ann Neurol [Suppl]* 44: S10-S18.
- Brouillet E, Beal MF (1993) NMDA antagonists partially protect against MPTP induced neurotoxicity in mice. *Neuroreport* 4: 387-390.
- Brudzynski SM, Wu M, Mogenson GJ (1988) Modulation of locomotor activity induced by injections of carbachol into the tegmental pedunculopontine nucleus and adjacent areas in the rat. *Brain Res* 451: 119-125.
- Bubser, M. (1992) Verhaltenspharmakologische und neurochemische Charakterisierung der Funktion von Dopamin im medialen präfrontalen Cortex der Ratte. Dissertation, Universität Stuttgart.
- Burbaud P, Gross C, Benazzouz A, Coussemaque M, Bioulac B (1995) Reduction of apomorphine-induced rotational behaviour by subthalamic lesion in 6-OHDA lesioned rats is associated with a normalization of firing rate and discharge pattern of pars reticulata neurons. *Exp Brain Res* 105: 48-58.
- Burke RE, Kholodilov NG (1998) Programmed cell death: does it play a role in Parkinson's disease? *Ann Neurol [Suppl]* 44: S126-S133.
- Burns LH, Everitt BJ, Kelley AE, Robbins TW (1994) Glutamate-dopamine interactions in the ventral striatum: role in locomotor activity and responding with conditioned reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 115: 516-528.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 4546-4550.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Marfia GA, Pisani A, Sancesario G, Bernardi G (2000a) Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 61: 231-265.
- Calabresi P, Giacomini P, Centonze D, Bernardi G (2000b) Levodopa-induced dyskinesia: A pathological form of striatal synaptic plasticity? *Ann Neurol* 47: S60-S69.
- Calon F, Goulet M, Blanchet PJ, Martel JC, Piercey MF, Bedard PJ, Di Paolo T (1995) Levodopa or D2 agonist induced dyskinesia in MPTP monkeys: correlation with changes in dopamine and GABA_A receptors in the striatopallidal complex. *Brain Res* 680: 43-52.
- Calon F, Grondin R, Morissette M, Goulet M, Blanchet PJ, Di Paolo T, Bedard PJ (2000a) Molecular basis of levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol [Suppl]* 47: S70-S78.
- Calon F, Morissette M, Goulet M, Grondin R, Blanchet PJ, Bédard PJ, Di Paolo T (1999) Chronic D1 and D2 dopaminomimetic treatment of MPTP-denervated monkeys: effects on basal ganglia GABA_A/benzodiazepine receptor complex and GABA content. *Neurochem Int* 35: 81-91.
- Calon F, Tahar AH, Blanchet PJ, Morissette M, Grondin R, Goulet M, Doucet JP, Robertson GS, Nestler E, Di-Paolo T, Bedard P (2000b) Dopamine-receptor stimulation: biobehavioral and biochemical consequences. *Trends Neurosci [Suppl]* 23: S92-S100.
- Carey RJ (1991) Chronic L-dopa treatment in the unilateral 6-OHDA rat: evidence for behavioral sensitization and biochemical tolerance. *Brain Res* 568: 205-214.

- Carlson JD, Pearlstein RD, Buchholz J, Iacono RP, Maeda G (1999) Regional metabolic changes in the pedunculopontine nucleus of unilateral 6-hydroxydopamine Parkinson's model rats. *Brain Res* 828: 12-19.
- Carlsson A, Lundqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-dihydroxyphenylalanin and 5-hydroxytryptophan as reserpin antagonists. *Nature* 180: 1200.
- Carlsson M, Carlsson A (1990) Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia - implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 13: 272-276.
- Carter CJ, Pycock CJ (1980) Behavioural and biochemical effects of dopamine and noradrenaline depletion within the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Res* 192: 163-176.
- Celsis P (2000) Age-related cognitive decline, mild cognitive impairment or preclinical Alzheimer's disease? *Ann Med* 32: 6-14.
- Cenci MA, Björklund A (1993) Transection of corticostriatal afferents reduces amphetamine- and apomorphine-induced striatal Fos expression and turning behaviour in unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur J Neurosci* 5: 1062-1070.
- Cenci MA, Lee CS, Björklund A (1998) L-DOPA-induced dyskinesia in the rat associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci* 10: 2694-2706.
- Cenci MA, Tranberg A, Andersson M, Hilbertson A (1999) Changes in the regional and compartmental distribution of FosB- and JunB-like immunoreactivity induced in the dopamine-denervated rat striatum by acute or chronic L-dopa treatment. *Neuroscience* 94: 515-527.
- Chapman DE, Keefe KA, Wilcox KS (2000) Different electrophysiological properties of NMDA receptors of medium-sized spiny neurons in medial versus lateral striatum. Abstract, Society for Neuroscience 30.
- Charton JP, Herkert M, Becker CM, Schroder H (1999) Cellular and subcellular localization of the 2B-subunit of the NMDA receptor in the adult rat telencephalon. *Brain Res* 816: 609-617.
- Chase TN (1998) The significance of continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs [Suppl]* 55: 1-9.
- Chase TN, Engber TM, Mouradian MM (1993) Striatal dopaminergic system changes and motor response complications in L-dopa-treated patients with advanced Parkinson's disease. *Adv Neurol* 60: 181-185.
- Chase TN, Oh JD (2000b) Striatal dopamine- and glutamate-mediated dysregulation in experimental parkinsonism. *Trends Neurosci [Suppl]* 23: S86-S91.
- Chase TN, Oh JD (2000a) Striatal mechanisms and pathogenesis of parkinsonian signs and motor complications. *Ann Neurol [Suppl]* 47: S122-S130.
- Chase TN, Oh JD, Konitsiotis S (2000) Antiparkinsonian and antidyskinetic activity of drugs targeting central glutamatergic mechanisms. *J Neurol [Suppl]* 247: 36-42.
- Cheetham SC, Kettle CJ, Martin KF, Heal DJ (1995) D1 receptor binding in rat striatum: modification by various D1 and D2 antagonists, but not by sibutramine hydrochloride, antidepressants or treatments which enhance central dopaminergic function. *J Neural Transm* 102: 35-46.
- Chen Q, Veenman CL, Reiner A (1996) Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits on specific striatal neuron types and its implication for striatal vulnerability in glutamate receptor-mediated excitotoxicity. *Neuroscience* 73: 715-731.
- Chenard BL, Menniti FS (1999) Antagonists selective for NMDA receptors containing the NR2B subunit. *Curr Pharmac Des* 5: 381-404.
- Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11: 465-469.

- Choi WS, Yoon SY, Oh TH, Choi EJ, O'Malley KL, Oh YJ (1999) Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP⁺-induced dopaminergic neuronal cell death: Role of caspases, ROS, and JNK. *J Neurosci Res* 57: 86-94.
- Chritin M, Feuerstein C, Savasta M (1993) Time-course of changes in striatal levels of DA uptake sites, DA D2 receptor and preproenkephalin mRNAs after nigrostriatal dopaminergic denervation in the rat. *Mol Brain Res* 19: 318-322.
- Clarke G, Collins RA, Leavitt BR, Andrews DF, Hayden MR, Lumsden CJ, McInnes RR (2000) A one-hit model of cell death in inherited neuronal degenerations. *Nature* 406: 195-199.
- Colpaert F (1987) Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology* 26: 1431-1440.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-237.
- Cooper AJ, Moser B, Mitchell IJ (1995a) A subset of striatopallidal neurons are Fos-immunopositive following acute monoamine depletion in the rat. *Neurosci Lett* 187: 189-192.
- Cooper AJ, Wooller S, Mitchell IJ (1995b) Elevated striatal Fos immunoreactivity following 6-hydroxydopamine lesioning of the rat is mediated by excitatory amino acid transmission. *Neurosci Lett* 194: 73-76.
- Cossette M, Lévesque M, Parent A (1999) Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neuroscience Research* 34: 51-54.
- Cotman CW, Monaghan DT, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1987) Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci* 10: 273-280.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of Parkinsonism-chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 280: 337-345.
- Counihan TJ, Landwehrmeyer GB, Standaert DG, Kosinski CM, Scherzer CR, Daggett LP, Velicelebi G, Young AB, Penney JB, Jr. (1998) Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the human brain: mesencephalic dopaminergic neurons. *J Comp Neurol* 390: 91-101.
- Cragg SJ, Greenfield SA (1997) Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurosci* 17: 5738-5746.
- Cutillas B, Espejo M, Gil J, Ferrer I, Ambrosio S (1999) Caspase inhibition protects nigral neurons against 6-OHDA-induced retrograde degeneration. *Neuroreport* 10: 2605-2608.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999a) The substantia nigra of the human brain I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D_{28K} immunohistochemistry. *Brain* 122: 1421-1436.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999b) The substantia nigra of the human brain II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122: 1437-1448.
- Danysz W, Parsons CG, Kornhuber J, Schmidt WJ (1997) Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents - preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 455-468.
- Date I, Felten DL, Felten SY (1990) Long-term effect of MPTP in the mouse brain in relation to aging: neurochemical and immunocytochemical analysis. *Brain Res* 519: 266-276.
- Dawson SJ, Yoon SO, Chikaraishi DM, Lillycrop KA, Latchman DS (1994) The Oct-2 transcription factor represses tyrosine hydroxylase expression via a heptamer TAATGARAT-like motif in the gene promoter. *Nucleic Acids Res* 22: 1023-1028.
- Delwaide PJ, Pepin JL, De Pasqua V, de Noordhout AM (2000) Projections from basal ganglia to tegmentum: a subcortical route for explaining the pathophysiology of Parkinson's disease signs? *J Neurol [Suppl]* 247: 75-81.

- Deutch AY, Roth RH (1999) Neurotransmitters. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds), pp 193-252. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.
- Di X, Bullock R, Watson J, Fatouros P, Chenard B, White F, Corwin F (1997) Effect of CP101,606, a novel NR2B subunit antagonist of the N-methyl-D- aspartate receptor, on the volume of ischemic brain damage off cytotoxic brain edema after middle cerebral artery occlusion in the feline brain. *Stroke* 28: 2244-2251.
- Diaz J, Pilon C, Le Foll B, Gros C, Triller A, Schwartz J-C, Sokoloff P (2000) Dopamin D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 20: 8677-8684.
- Doble A (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacol Ther* 81: 163-221.
- Dodel RC, Du YS, Bales KR, Ling ZD, Carvey PM, Paul SM (1999) Caspase-3-like proteases and 6-hydroxydopamine induced neuronal cell death. *Mol Brain Res* 64: 141-148.
- Donoghue JP, Herkenham M (1986) Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res* 365: 397-403.
- Doucet J-P, Nakabeppu Y, Bédard PJ, Hope BT, Nestler EJ, Jasmin BJ, Chen J-S, Iadarola MJ, St-Jean M, Wigle N, Blanchet PJ, Grondin R, Robertson GS (1996) Chronic alterations in dopaminergic neurotransmission produce a persistent elevation of Δ FosB-like protein(s) in both the rodent and primate striatum. *Eur J Neurosci* 8: 365-381.
- Dragunow M, Butterworth N, Waldvogel HJ, Faull RLM, Nicholson LF (1995) Prolonged expression of Fos-related antigens, JunB and TrkB in dopamine-denervated striatal neurons. *Mol Brain Res* 30: 393-396.
- Dragunow M, Leah JD, Faull RLM (1991) Prolonged and selective induction of Fos-related antigen(s) in striatal neurons after 6-hydroxydopamine lesions of the rat substantia nigra pars compacta. *Mol Brain Res* 10: 355-358.
- Dragunow M, Preston K (1995) The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death. *Brain Res Rev* 21: 1-28.
- Dragunow M, Robertson GS, Faull RLM, Robertson HA (1990) D2 dopamine receptor antagonists induce Fos and related proteins in rat striatal neurons. *Neuroscience* 37: 287-294.
- Dunah AW, Wang Y, Yasuda RP, Kameyama K, Haganir RL, Wolfe BB, Standaert DG (2000) Alterations in subunit expression, composition, and phosphorylation of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Mol Pharmacol* 57: 342-352.
- Dunnett SB, Björklund A (1999) Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature [Suppl]* 399: A33-A39.
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klinische Wochenschrift* 1236-1239.
- Elsworth JD, Taylor JR, Sladek JR, Jr., Collier TJ, Redmond DE, Jr., Roth RH (2000) Striatal dopaminergic correlates of stable parkinsonism and degree of recovery in old-world primates one year after MPTP treatment. *Neuroscience* 95: 399-408.
- Engber TM, Susel Z, Kuo S, Chase TN (1990) Chronic levodopa treatment alters basal and dopamine agonist-stimulated cerebral glucose utilization. *J Neurosci* 10: 3889-3895.
- Engber TM, Susel Z, Kuo S, Gerfen CR, Chase TN (1991) Levodopa replacement therapy alters enzyme activities in striatum and neuropeptide content in striatal regions of 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 552: 113-118.
- Faleiro L, Lazebnik Y (2000) Caspases Disrupt the Nuclear-Cytoplasmic Barrier. *J Cell Biol* 151: 951-960.

- Farb CR, Aoki C, Le Doux JE (1995) Differential localization of NMDA and AMPA receptor subunits in the lateral and basal nuclei of the amygdala: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 362: 86-108.
- Fariello RG (1998) Pharmacodynamic and pharmacokinetic features of cabergoline. Rationale for use in Parkinson's disease. *Drugs [Suppl]* 55 1: 10-16.
- Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114: 2283-2301.
- Filloux F, Dawson TM, Wamsley JK (1988) Localization of nigrostriatal dopamine receptor subtypes and adenylate cyclase. *Brain Res Bull* 20: 447-459.
- Fink H, Morgenstern R (1985) Locomotor effects of lisuride: a consequence of dopaminergic and serotonergic actions. *Psychopharmacology* 85: 464-468.
- Finkelstein DI, Stanic D, Parish CL, Tomas D, Dickson K, Horne MK (2000) Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra. *Neuroscience* 97: 99-112.
- Fix AS, Horn JW, Wightman KA, Johnson CA, Long GG, Storts RW, Farber N, Wozniak DF, Olney JW (1993) Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK(+)-801 (dizocilpine maleate): a light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex. *Exp Neurol* 123: 204-215.
- Fletcher GH, Starr MS (1987) Behavioural evidence for the functionality of D-2 but not D-1 dopamine receptors at multiple brain sites in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Eur J Pharmacol* 138: 407-411.
- Gaspar P, Febvret A, Colombo J (1993) Serotonergic sprouting in primate MTP-induced hemiparkinsonism. *Exp Brain Res* 96: 100-106.
- Gass P, Herdegen T (1995) Neuronal expression of AP-1 proteins in excitotoxic-neurodegenerative disorders and following nerve fiber lesion. *Prog Neurobiol* 47: 257-290.
- Gassen M, Gross A, Youdim MBH (1998) Antioxidant and cytoprotective properties of apomorphine. In: *Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases* (Fisher A, ed), pp 421-427. New York: Plenum Press.
- Gasser T (1998) Genetics of Parkinson's disease. *Clin Genet* 54: 259-265.
- Gauthier J, Parent M, Lévesque M, Parent A (1999) The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res* 834: 228-232.
- Gerfen CR (1984) The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311: 461-464.
- Gerfen CR, Baimbridge KG, Thibault J (1987a) The neostriatal mosaic: III. Biochemical and developmental dissociation of patch-matrix mesostriatal systems. *J Neurosci* 7: 3935-3944.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429-1432.
- Gerfen CR, Herkenham M, Thibault J (1987b) The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci* 7: 3915-3934.
- Gerlach M, Riederer P (1996) Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* 103: 987-1041.
- German DC, Manaye KF, Sonsalla PK, Brooks BA (1992) Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease and MPTP-induced parkinsonism: sparing of calbindin-D28k-containing cells. *Ann N Y Acad Sci* 648: 42-62.
- Glinka Y, Gassen M, Youdim MBH (1996) Mechanisms of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Adv Res Neurodegen* 5: 55-66.

- Goedert M, Spillantini MG, Davies SW (1998) Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. *Curr Op Neurobiol* 8: 619-632.
- Goulet M, Morissette M, Calon F, Blanchet PJ, Falardeau P, Di Paolo T (1997) Continuous or pulsatile chronic D2 dopamine receptor agonist (U91356A) treatment of drug-naive 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys differentially regulates brain D1 and D2 receptor expression: *in situ* hybridization histochemical analysis. *Neuroscience* 79: 497-507.
- Grace AA (1991) Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41: 1-24.
- Gracy KN, Pickel VM (1995) Comparative ultrastructural localization of the NMDAR1 glutamate receptor in the rat basolateral amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 362: 71-85.
- Graeber MB, Grasbon FE, Abell AP, Kosel S (1999) Nigral neurons are likely to die of a mechanism other than classical apoptosis in Parkinson's disease. *Parkinsonism Rel Disord* 5: 187-192.
- Grandas F, Galiano ML, Taberner C (1999) Risk factors for levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *J Neurol* 246: 1127-1133.
- Graybiel AM (1990) The basal ganglia and the initiation of movement. *Rev Neurol* 146: 570-574.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M (1994) The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* 265: 1826-1831.
- Grimwood S, Richards P, Murray F, Harrison N, Wingrove PB, Hutson PH (2000) Characterisation of N-methyl-D-aspartate receptor-specific [(3)H]ifenprodil binding to recombinant human NR1a/NR2B receptors compared with native receptors in rodent brain membranes. *J Neurochem* 75: 2455-2463.
- Grondin R, Goulet M, Di Paolo T, Bédard PJ (1996) Cabergoline, a long-acting dopamine D2-like receptor agonist, produces a sustained antiparkinsonian effect with transient dyskinesias in parkinsonian drug-naive primates. *Brain Res* 735: 298-306.
- Grünblatt E, Mandel S, Berkuzki T, Youdim MBH (1999a) Apomorphine protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Mov Disord* 14: 612-618.
- Grünblatt E, Mandel S, Gassen M, Youdim MBH (1999b) Potent neuroprotective and antioxidant activity of apomorphine in MPTP and 6-hydroxydopamine induced neurotoxicity. *Adv Res Neurodegen* 6: 57-70.
- Guiramand J, Montmayeur JP, Ceraline J, Bhatia M, Borrelli E (1995) Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins. *J Biol Chem* 270: 7354-7358.
- Gundersen HJ, Jensen EB (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147: 229-263.
- Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Möller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sörensen FB, Vesterby A, West MJ (1988a) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Scand* 96: 857-881.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Möller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sörensen FB, Vesterby A, West MJ (1988b) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Scand* 96: 379-394.
- Guo Z, Du X, Iacovitti L (1998) Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression during transdifferentiation of striatal neurons: changes in transcription factors binding the AP-1 site. *J Neurosci* 18: 8163-8174.
- Haber SN, Ryoo H, Cox C, Lu W (1995) Subsets of midbrain dopaminergic neurons in monkeys are distinguished by different levels of mRNA for the dopamine transporter: comparison with the mRNA for the D2 receptor, tyrosine hydroxylase and calbindin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 362: 400-410.

- Hagan JJ, Middlemiss DN, Sharpe PC, Poste GH (1997) Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. *Trends Pharmacol Sci* 18: 156-163.
- Halliday GM, Harding A, Paxinos G (1995) Serotonin and tachykinin systems. In: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed), pp 929-974. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.
- Hara K, Ikoma Y, Oshino N (1982) Effects of an ergot derivative, lisuride, on the central dopaminergic system - studies of behavioral pharmacology. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 80: 1-13.
- Hardy J, Gwinn-Hardy K (1998) Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science* 282: 1075-1079.
- Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC (2000) Caspase-3: a vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2875-2880.
- Hastings TG, Lewis DA, Zigmond MJ (1996) Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1956-1961.
- Hastings TG, Zigmond MJ (1997) Loss of dopaminergic neurons in parkinsonism: possible role of reactive dopamine metabolites. *Adv Res Neurodegen* 3-4: 103-110.
- Hauber, W. (1992) *Motorische und kognitive Aspekte der Dopamin-Glutamat Interaktion in den Basalganglien der Ratte*. Dissertation, Universität Stuttgart.
- Hauber W, Bohn I, Gierler C (2000) NMDA, but not dopamine D(2), receptors in the rat nucleus accumbens are involved in guidance of instrumental behavior by stimuli predicting reward magnitude. *J Neurosci* 20: 6282-6288.
- Hauber W, Lutz S (1999) Dopamine D1 or D2 receptor blockade in the globus pallidus produces akinesia in rats. *Behav Brain Res* 106: 143-150.
- He L, Di Monte DA, Langston JW, Quik M (2000b) Autoradiographic analysis of N-methyl-D-aspartate receptor binding in monkey brain: Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and levodopa treatment. *Neuroscience* 99: 697-704.
- He Y, Lee T, Leong SK (2000a) 6-hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra. *Brain Res* 858: 163-166.
- Hebb MO, Robertson HA (1999) Motor effects and mapping of cerebral alterations in animal models of Parkinson's and Huntington's diseases. *J Comp Neurol* 410: 99-114.
- Hedreen JC (1999) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive elements in the human globus pallidus and subthalamic nucleus. *J Comp Neurol* 409: 400-410.
- Heffner TG, Hartman JA, Seiden LS (1980) A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 13: 453-456.
- Hefti F, Enz A, Melamed E (1985) Partial lesions of the nigrostriatal pathway in the rat. Acceleration of transmitter synthesis and release of surviving dopaminergic neurones by drugs. *Neuropharmacology* 24: 19-23.
- Heikkila RE, Cohen G (1972) In vivo generation of hydrogen peroxide from 6-hydroxydopamine. *Experientia* 28: 1197-1198.
- Heimer L, Switzer RD, van Hoesen GW (1982) Ventral striatum and ventral pallidum. Components of the motor system? *Trends Neurosci* 3: 83-87.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
- Henneberry RC, Novelli A, Cox JA, Lysko PG (1989) Neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in energy-compromised neurons. A hypothesis for cell death in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci* 568: 225-233.

- Henry B, Crossman AR, Brotchie JM (1998) Characterization of enhanced behavioral responses to L-DOPA following repeated administration in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 151: 334-342.
- Henry B, Crossman AR, Brotchie JM (1999) Effect of repeated L-DOPA, bromocriptine, or lisuride administration on preproenkephalin-A and preproenkephalin-B mRNA levels in the striatum of the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Exp Neurol* 155: 204-220.
- Herdegen T, Kovary K, Buhl A, Bravo R, Zimmermann M, Gass P (1995) Basal expression of the inducible transcription factors c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB and Krox-24 in the adult rat brain. *J Comp Neurol* 354: 39-56.
- Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Rev* 28: 370-490.
- Herrera DG, Robertson HA (1996) Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 50: 83-107.
- Herrero MT, Augood SJ, Hirsch EC, Javoy-Agid F, Luquin MR, Agid Y, Obeso JA, Emson PC (1995) Effects of L-DOPA on preproenkephalin and preprotachykinin gene expression in the MPTP-treated monkey striatum. *Neuroscience* 68: 1189-1198.
- Herrero MT, Hirsch EC, Javoy-Agid F, Obeso JA, Agid Y (1993) Differential vulnerability to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine of dopaminergic and cholinergic neurons in the monkey mesopontine tegmentum. *Brain Res* 624: 281-285.
- Hirsch EC, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334: 345-348.
- Hirsch EC, Graybiel AM, Duyckaerts C, Javoy-Agid F (1987) Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5976-5980.
- Hirsch EC, Mouatt A, Thomasset M, Javoy-Agid F, Agid Y, Graybiel AM (1992) Expression of Calbindin D_{28K}-like immunoreactivity in catecholaminergic cell groups of the human midbrain: normal distribution and distribution in Parkinson's disease. *Neurodegeneration* 1: 83-93.
- Hirsch EC, Perier C, Orioux G, Francois C, Feger J, Yelnik J, Vila M, Levy R, Tolosa ES, Marin C, Herrero MT, Obeso JA, Agid Y (2000) Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. *Trends Neurosci [Suppl]* 23: S78-S85.
- Hollen KM, Nakabeppu Y, Davies SW (1997) Changes in expression of Δ FosB and the Fos family proteins following NMDA receptor activation in the rat striatum. *Mol Brain Res* 47: 31-43.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.
- Hontanilla B, Parent A, de las HS, Gimenez-Amaya JM (1998) Distribution of calbindin D-28k and parvalbumin neurons and fibers in the rat basal ganglia. *Brain Res Bull* 47: 107-116.
- Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ (1992) Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5764-5768.
- Horowski R, Wachtel H (1976) Direct dopaminergic action of lisuride hydrogen maleate, an ergot derivative, in mice. *Eur J Pharmacol* 36: 373-383.
- Hruska RE, Silbergeld EK (1981) Inhibition of neurotransmitter receptor binding by ergot derivatives. *J Neurosci Res* 6: 1-11.
- Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, Wong J, Takenouchi T, Hashimoto M, Masliah E (2000) alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am J Pathol* 157: 401-410.
- Hu XT, White FJ (1996) Glutamate receptor regulation of rat nucleus accumbens neurons in vivo. *Synapse* 23: 208-218.

- Hurtig HI, Trojanowski JQ, Galvin J, Ewbank D, Schmidt ML, Lee VMY, Clark CM, Glosser G, Stern MB, Gollomp SM, Arnold SE (2000) Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 54: 1916-1921.
- Hümpel M, Toda T, Oshino N, Pommerenke G (1981) The pharmacokinetics of lisuride hydrogen maleate in rat, rabbit and rhesus monkey. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 6: 207-219.
- Iacopino AM, Christakos S (1990) Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4078-4082.
- Icard-Liepkalns C, Biguet NF, Vyas S, Robert JJ, Sassone-Corsi P, Mallet J (1992) AP-1 complex and c-fos transcription are involved in TPA provoked and trans-synaptic inductions of the tyrosine hydroxylase gene: insights into long-term regulatory mechanisms. *J Neurosci Res* 32: 290-298.
- Ichitani Y, Okamura H, Matsumoto Y, Nagatsu I, Iyata Y (1991) Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. *Brain Res* 549: 350-353.
- Ichitani Y, Okamura H, Nakahara D, Nagatsu I, Iyata Y (1994) Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in the substantia nigra. *Exp Neurol* 130: 269-278.
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283: 70-74.
- Ikonomidou C, Stefovskaja V, Turski L (2000) Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12885-12890.
- Inglis WL, Winn P (1995) The pedunculopontine tegmental nucleus: where the striatum meets the reticular formation. *Prog Neurobiol* 47: 1-29.
- Iwata S, Nomoto M, Kaseda S, Tanoue S, Shimosaka M, Fukuda T (2000) TH protein and mRNA in nigrostriatal dopaminergic neurons are down-regulated by continuous but not intermittent apomorphine. *Mol Brain Res* 82: 133-136.
- Jellinger KA (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14: 153-197.
- Jellinger KA (2000) Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 107: 1-29.
- Jenkins R, O'Shea R, Thomas K, Hunt SP (1993) C-jun expression in substantia nigra neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesions in the rat. *Neuroscience* 53: 447-455.
- Jenner P (2000) Pathophysiology and biochemistry of dyskinesia: clues for the development of non-dopaminergic treatments. *J Neurol [Suppl]* 247: 43-50.
- Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE (1995) 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* 4: 131-137.
- Jian M, Staines WA, Iadarola MJ, Robertson GS (1993) Destruction of the nigrostriatal pathway increases Fos-like immunoreactivity predominantly in striatopallidal neurons. *Mol Brain Res* 19: 156-160.
- Johnson SK, Fisher H, Wagner GC (1993) Partial 6-hydroxydopamine-induced lesions and haloperidol-induced catalepsy. *Neuropharmacology* 32: 273-278.
- Johnston RE, Schallert T, Becker JB (1999) Akinesia and postural abnormality after unilateral dopamine depletion. *Behav Brain Res* 104: 189-196.
- Jones-Humble SA, Morgan PF, Cooper BR (1994) The novel anticonvulsant lamotrigine prevents dopamine depletion in C57 black mice in the MPTP animal model of Parkinson's disease. *Life Sci* 54: 245-252.
- Kaakkola S, Teravainen H (1990) Animal models of parkinsonism. *Pharmacol Toxicol* 67: 95-100.

- Kalivas PW (1995) Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants. *Drug Alcohol Depend* 37: 95-100.
- Kalivas PW, Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Rev* 16: 223-244.
- Kaur S, Ozer H, Starr M (1997) MK 801 reverses haloperidol-induced catalepsy from both striatal and extrastriatal sites in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 332: 153-160.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18: 527-535.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93-96.
- Keefe KA, Ganguly A (1998) Effects of NMDA receptor antagonists on D1 dopamine receptor-mediated changes in striatal immediate early gene expression: evidence for involvement of pharmacologically distinct NMDA receptors? *Dev Neurosci* 20: 216-228.
- Kermer P, Klöcker N, Labes M, Thomsen S, Srinivasan A, Bähr M (1999) Activation of caspase-3 in axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *FEBS Lett* 453: 361-364.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Kew JN, Kemp JA (1998) An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurones. *J Physiol (Lond)* 512: 17-28.
- Kholodilov NG, Oo TF, Burke RE (1999) Synuclein expression is decreased in rat substantia nigra following induction of apoptosis by intrastriatal 6-hydroxydopamine. *Neurosci Lett* 275: 105-108.
- Kilpatrick IC, Jones MW, Phillipson OT (1986) A semiautomated analysis method for catecholamines, indoleamines, and some prominent metabolites in microdissected regions of the nervous system: an isocratic HPLC technique employing coulometric detection and minimal sample preparation. *J Neurochem* 46: 1865-1876.
- Kim BG, Shin DH, Jeon GS, Seo JH, Kim YW, Jeon BS, Cho SS (2000) Relative sparing of calretinin containing neurons in the substantia nigra of 6-OHDA treated rat Parkinsonian model. *Brain Res* 855: 162-165.
- Kincaid AE, Wilson CJ (1996) Corticostriatal innervation of the patch and matrix in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 374: 578-592.
- Kirik D, Rosenblad C, Bjorkland A, Mandel RJ (2000) Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat parkinson's model: Intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J Neurosci* 20: 4686-4700.
- Kirik D, Rosenblad C, Björklund A (1998) Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* 152: 259-277.
- Kita H, Kitai ST (1987) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol* 260: 435-452.
- Klockgether T, Turski L (1990) NMDA antagonists potentiate antiparkinsonian actions of L-dopa in monoamine-depleted rats. *Ann Neurol* 28: 539-546.
- Kosinski CM, Standaert DG, Coughlin TJ, Scherzer CR, Kerner JA, Daggett LP, Velicelebi G, Penney JB, Young AB, Landwehrmeyer GB (1998) Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the human brain: striatum and globus pallidus. *J Comp Neurol* 390: 63-74.
- Köhler C, Hall H, Ogren SO, Gawell L (1985) Specific in vitro and in vivo binding of ³H-raclopride. A potent substituted benzamide drug with high affinity for dopamine D-2 receptors in the rat brain. *Biochem Pharmacol* 34: 2251-2259.
- Kumer SC, Vrana KE (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67: 443-462.

- Küppenbender KD, Standaert DG, Feuerstein TJ, Penney JB, Young AB, Landwehrmeyer GB (2000) Expression of NMDA receptor subunit mRNAs in neurochemically identified projection and interneurons in the human striatum. *J Comp Neurol* 419: 407-421.
- Lange KW, Kornhuber J, Riederer P (1997) Dopamine/glutamate interactions in Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 393-400.
- Lange KW, Löschmann PA, Sofic E, Burg M, Horowski R, Kalveram KT, Wachtel H, Riederer P (1993) The competitive NMDA antagonist CPP protects substantia nigra neurons from MPTP-induced degeneration in primates. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 348: 586-592.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979-980.
- Lavoie B, Parent A (1991) Dopaminergic neurons expressing calbindin in normal and parkinsonian monkeys. *Neuroreport* 2: 601-604.
- Lavoie B, Parent A (1994) Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: distribution of cholinergic and monoaminergic neurons in the mesopontine tegmentum with evidence for the presence of glutamate in cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 344: 190-209.
- Lee CS, Sauer H, Björklund A (1996) Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neuroscience* 72: 641-653.
- Lee S, Williamson J, Lothman EW, Szele FG, Chesselet MF, Von Hagen S, Sapolsky RM, Mattson MP, Christakos S (1997) Early induction of mRNA for calbindin-D_{28k} and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment. *Mol Brain Res* 47: 183-194.
- Lees AJ, Stern GM (1981) Sustained bromocriptine therapy in previously untreated patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44: 1020-1023.
- Legendre P, Westbrook GL (1991) Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism. *Mol Pharmacol* 40: 289-298.
- Lera G, Vaamonde J, Rodriguez M, Obeso JA (1993) Cabergoline in Parkinson's disease: long-term follow-up. *Neurology* 43: 2587-2590.
- LeWitt PA, Burns RS, Calne DB (1983b) Lisuride treatment in Parkinson's disease: clinical and pharmacokinetic studies. *Adv Neurol* 37: 131-140.
- LeWitt PA, Ward CD, Larsen TA, Raphaelson MI, Newman RP, Foster N, Dambrosia JM, Calne DB (1983a) Comparison of pergolide and bromocriptine therapy in parkinsonism. *Neurology* 33: 1009-1014.
- Li Y, Hu XT, Berney TG, Vartanian AJ, Stine CD, Wolf ME, White FJ (1999) Both glutamate receptor antagonists and prefrontal cortex lesions prevent induction of cocaine sensitization and associated neuroadaptations. *Synapse* 34: 169-180.
- Liang C-L, Sinton CM, Sonsalla PK, German DC (1996) Midbrain dopaminergic neurons in the mouse that contain calbindin-D_{28k} exhibit reduced vulnerability to MPTP-induced neurodegeneration. *Neurodegeneration* 5: 313-318.
- Lindner MD, Cain CK, Plone MA, Frydel BR, Blaney TJ, Emerich DF, Hoane MR (1999) Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behav Brain Res* 102: 1-16.
- Lindner MD, Plone MA, Francis JM, Blaney TJ, Salamone JD, Emerich DF (1997) Rats with partial striatal dopamine depletions exhibit robust and long-lasting behavioral deficits in a simple fixed-ratio bar-pressing task. *Behav Brain Res* 86: 25-40.
- Lokwan SJ, Overton PG, Berry MS, Clark D (1999) Stimulation of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat produces burst firing in A9 dopaminergic neurons. *Neuroscience* 92: 245-254.
- Lozano AM, Lang AE, Levy R, Hutchison W, Dostrovsky J (2000) Neuronal recordings in Parkinson's disease patients with dyskinesias induced by apomorphine. *Ann Neurol [Suppl]* 47: S141-S146.

- Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic activity of sodium-L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 58: 193-201.
- Luthman J, Bolioli B, Tsutsumi T, Verhofstad A, Jonsson G (1987) Sprouting of striatal serotonin nerve terminals following selective lesions of nigro-striatal dopamine neurons in neonatal rat. *Brain Res Bull* 19: 269-274.
- MacGibbon GA, Lawlor PA, Walton M, Sirimanne E, Faull RLM, Synek B, Mee E, Connor B, Dragunow M (1997) Expression of Fos, Jun, and Krox family proteins in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 147: 316-332.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation - a decade of progress? *Science* 285: 1870-1874.
- Mantegani S, Brambilla E, Varasi M (1999) Ergoline derivatives: receptor affinity and selectivity. *Farmacologia* 54: 288-296.
- Marin C, Jimenez A, Bonastre M, Chase TN, Tolosa E (2000) Non-NMDA receptor-mediated mechanisms are involved in levodopa-induced motor response alterations in parkinsonian rats. *Synapse* 36: 267-274.
- Marona-Lewicka D, Kurrasch-Orbaugh D, Selken JR, Cumbay MG, Nichols DE (2000) 5-Hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated behavioral effects of lisuride overlap its other properties. Abstract, Society for Neuroscience 30.
- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8: 2804-2815.
- Marti MJ, James CJ, Oo TF, Kelly WJ, Burke RE (1997) Early developmental destruction of terminals in the striatal target induces apoptosis in dopamine neurons of the substantia nigra. *J Neurosci* 17: 2030-2039.
- Marti MJ, Jimenez A, Bonastre M, Saura J, Tolosa E (2000) Intra-striatal 6-Hydroxydopamine induces apoptosis in nigral neurons in the adult rat. Abstract, Society for Neuroscience 30.
- Maslah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in α -synuclein mice: implication for neurodegenerative disorders. *Science* 287: 1265-1268.
- Mattila PM, Rinne JO, Helenius H, R ytt  M (1999) Neuritic degeneration in the hippocampus and amygdala in Parkinson's disease in relation to Alzheimer pathology. *Acta Neuropathol* 98: 157-164.
- Mattson MP, Keller JN, Begley JG (1998) Evidence for synaptic apoptosis. *Exp Neurol* 153: 35-48.
- McGeorge AJ, Faull RL (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29: 503-537.
- McRitchie DA, Hardman CD, Halliday GM (1996) Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans. *J Comp Neurol* 364: 121-150.
- Menegoz M, Lau LF, Herve D, Haganir RL, Girault JA (1995) Tyrosine phosphorylation of NMDA receptor in rat striatum: effects of 6-OH-dopamine lesions. *Neuroreport* 7: 125-128.
- Menniti F, Chenard B, Collins M, Ducat M, Shalaby I, White F (1997) CP-101,606, a potent neuroprotectant selective for forebrain neurons. *Eur J Pharmacol* 331: 117-126.
- Menniti FS, Pagnozzi MJ, Butler P, Chenard BL, Jaw TS, White WF (2000) CP-101,606, an NR2B subunit selective NMDA receptor antagonist, inhibits NMDA and injury induced c-fos expression and cortical spreading depression in rodents. *Neuropharmacology* 39: 1147-1155.
- Messersmith DJ, Gu J, Dubner R, Douglass J, Iadarola MJ (1994) Basal and inducible transcriptional activity of an upstream AP-1/CRE element (DYNCRE3) in the prodynorphin promoter. *Mol Cell Neurosci* 5: 238-245.
- Michaelis EK (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54: 369-415.

- Milner KL, Mogenson GJ (1988) Electrical and chemical activation of the mesencephalic and subthalamic locomotor regions in freely moving rats. *Brain Res* 452: 273-285.
- Mink JW (1999) Basal Ganglia. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds), pp 951-972. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.
- Mitchell IJ, Carroll CB (1997) Reversal of parkinsonian symptoms in primates by antagonism of excitatory amino acid transmission: potential mechanisms of action. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 469-475.
- Mitchell IJ, Clarke CE, Boyce S, Robertson RG, Peggs D, Sambrook MA, Crossman AR (1989) Neural mechanisms underlying parkinsonian symptoms based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience* 32: 213-226.
- Miyagi M, Arai N, Taya F, Itoh F, Komatsu Y, Kojima M, Isaji M (1996b) Effect of cabergoline, a long-acting dopamine D2 agonist, on reserpine-treated rodents. *Biol Pharm Bull* 19: 1499-1502.
- Miyagi M, Itoh F, Taya F, Arai N, Isaji M, Kojima M, Ujii A (1996a) Dopamine receptor affinities in vitro and stereotypic activities in vivo of cabergoline in rats. *Biol Pharm Bull* 19: 1210-1213.
- Montastruc JL, Rascol O, Rascol A (1989) A randomised controlled study of bromocriptine versus levodopa in previously untreated Parkinsonian patients: a 3 year follow-up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52: 773-775.
- Montastruc JL, Rascol O, Senard JM (1997) Glutamate antagonists and Parkinson's disease: a review of clinical data. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 477-480.
- Montastruc JL, Rascol O, Senard JM, Rascol A (1992) A pilot study of N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55: 630-631.
- Montmayeur JP, Guiramand J, Borrelli E (1993) Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins. *Mol Endocrinol* 7: 161-170.
- Morelli M, Fenu S, Carta A, Di Chiara G (1996) Effect of MK 801 on priming of D1-dependent contralateral turning and its relationship to c-fos expression in the rat caudate-putamen. *Behav Brain Res* 79: 93-100.
- Morissette M, Goulet M, Calon F, Falardeau P, Blanchet PJ, Bédard PJ, Di Paola R (1996) Changes of D1 and D2 dopamine receptor mRNA in the brains of monkeys lesioned with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: correction with chronic administration of L-3,4-dihydroxyphenylalanine. *Mol Pharmacol* 50: 1073-1079.
- Morissette M, Grondin R, Goulet M, Bedard PJ, Di Paolo T (1999) Differential regulation of striatal preproenkephalin and preprotachykinin mRNA levels in MPTP-lesioned monkeys chronically treated with dopamine D1 or D2 receptor agonists. *J Neurochem* 72: 682-692.
- Mott DD, Doherty JJ, Zhang S, Washburn MS, Fendley MJ, Lyuboslavsky P, Traynelis SF, Dingledine R (1998) Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci* 1: 659-667.
- Munro-Davies LE, Winter J, Aziz TZ, Stein JF (1999) The role of the pedunculo-pontine region in basal-ganglia mechanisms of akinesia. *Exp Brain Res* 129: 511-517.
- Munson PJ, Rodbard D (1980) Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107: 220-239.
- Nakao N, Ogura M, Nakai K, Itakura T (1998) Intra-striatal mesencephalic grafts affect neuronal activity in basal ganglia nuclei and their target structures in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 18: 1806-1817.
- Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA (1998) Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 18: 3659-3668.

- Nash JE, Fox SH, Henry B, Hill MP, Peggs D, McGuire S, Maneuf Y, Hille C, Brotchie JM, Crossman AR (2000) Antiparkinsonian actions of ifenprodil in the MPTP-lesioned marmoset model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 165: 136-142.
- Nash JE, Hill MP, Brotchie JM (1999) Antiparkinsonian actions of blockade of NR2B-containing NMDA receptors in the reserpine-treated rat. *Exp Neurol* 155: 42-48.
- Nemoto C, Hida T, Arai R (1999) Calretinin and calbindin-D28k in dopaminergic neurons of the rat midbrain: a triple-labeling immunohistochemical study. *Brain Res* 846: 129-136.
- Nestler EJ, Kelz MB, Chen JS (1999) Δ FosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res* 835: 10-17.
- Ng MC, Iacopino AM, Quintero EM, Marches F, Sonsalla PK, Liang CL, Speciale SG, German DC (1996) The neurotoxin MPTP increases calbindin-D28k levels in mouse midbrain dopaminergic neurons. *Mol Brain Res* 36: 329-336.
- Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Diff* 6: 1028-1042.
- Nicotera P, Leist M, Fava E, Berliocchi L, Volbracht C (2000) Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death. *Brain Pathol* 10: 276-282.
- Nicotera P, Leist M, Manzo L (1999) Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 20: 46-51.
- Nisbet AP, Foster OJ, Kingsbury A, Eve DJ, Daniel SE, Marsden CD, Lees AJ (1995) Preproenkephalin and preprotachykinin messenger RNA expression in normal human basal ganglia and in Parkinson's disease. *Neuroscience* 66: 361-376.
- Nutt JG, Carter JH (2000) Apomorphine can sustain the long-duration response to L-DOPA in fluctuating PD. *Neurology* 54: 247-250.
- O'Callaghan JP, Miller DB, Pennypacker KR (2000) Chronic dopaminergic signaling in the basal ganglia: a damage perspective on kinases and fos-related antigens. *Add Biol* 5: 369-376.
- O'Hara CM, Uhland-Smith A, O'Malley KL, Todd RD (1996) Inhibition of dopamine synthesis by dopamine D2 and D3 but not D4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 186-192.
- Obeso JA, Grandas F, Herrero MT, Horowski R (1994) The role of pulsatile versus continuous dopamine receptor stimulation for functional recovery in Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 6: 889-897.
- Obeso JA, Olanow CW, Nutt JG (2000a) Basal ganglia, Parkinson's disease and levodopa therapy. *Trends Neurosci [Suppl]* 23: S1.
- Obeso JA, Olanow CW, Nutt JG (2000b) Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci [Suppl]* 23: S2-S7.
- Ochu EE, Rothwell NJ, Waters CM (1998) Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *J Neurochem* 70: 2637-2640.
- Oh JD, Russell D, Vaughan CL, Chase TN (1998) Enhanced tyrosine phosphorylation of striatal NMDA receptor subunits: effect of dopaminergic denervation and L-DOPA administration. *Brain Res* 813: 150-159.
- Oh JD, Vaughan CL, Chase TN (1999) Effects of dopamine denervation and dopamine agonist administration on serine phosphorylation of striatal NMDA receptor subunits. *Brain Res* 821: 433-442.
- Okiyama K, Smith DH, White WF, Richter K, McIntosh TK (1997) Effects of the novel NMDA antagonists CP-98,113, CP-101,581 and CP-101,606 on cognitive function and regional cerebral edema following experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 14: 211-222.
- Olanow CW, Jenner P, Brooks D (1998) Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol [Suppl]* 44: S167-S174.

- Olanow CW, Schapira AHV, Rascol O (2000) Continuous dopamine-receptor stimulation in early Parkinson's disease. *Trends Neurosci [Suppl]* 23: S117-S126.
- Olanow CW, Tatton WG (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 22: 123-144.
- Olney JW (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: Kainic acid as a tool in neurobiology (McGeer EG, Olney JW, McGeer PL, eds), pp 95-112. New York: Raven Press.
- Olney JW, Labruyere J, Price MT (1989) Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science* 244: 1360-1362.
- Olney JW, Labruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA (1991) NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 254: 1515-1518.
- Onn SP, Berger TW, Stricker EM, Zigmond MJ (1986) Effects of intraventricular 6-hydroxydopamine on the dopaminergic innervation of striatum: histochemical and neurochemical analysis. *Brain Res* 376: 8-19.
- Onn SP, West AR, Grace AA (2000) Dopamine-mediated regulation of striatal neuronal and network interactions. *Trends Neurosci [Suppl]* 23: S48-S56.
- Orieux G, Francois C, Féger J, Yelnik J, Vila M, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC (2000) Metabolic activity of excitatory parafascicular and pedunculopontine inputs to the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 97: 79-88.
- Ozer H, Ekinici AC, Starr MS (1997) Dopamine D1- and D2-dependent catalepsy in the rat requires functional NMDA receptors in the corpus striatum, nucleus accumbens and substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 777: 51-59.
- Pahapill PA, Lozano AM (2000) The pedunculopontine nucleus and Parkinson's disease. *Brain* 123: 1767-1783.
- Palombo E, Porrino LJ, Bankiewicz KS, Crane AM, Sokoloff L, Kopin IJ (1990) Local cerebral glucose utilization in monkeys with hemiparkinsonism induced by intracarotid infusion of the neurotoxin MPTP. *J Neurosci* 10: 860-869.
- Paquet M, Tremblay M, Soghomonian JJ, Smith Y (1997) AMPA and NMDA glutamate receptor subunits in midbrain dopaminergic neurons in the squirrel monkey: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neurosci* 17: 1377-1396.
- Parent A, Sato F, Wu Y, Gauthier J, Levesque M, Parent M (2000) Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends Neurosci [Suppl]* 23: S20-S27.
- Parkes JD, Schachter M, Marsden CD, Smith B, Wilson A (1981) Lisuride in parkinsonism. *Ann Neurol* 9: 48-52.
- Paxinos G, Watson C (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, CA: Academic Press.
- Pearce RK, Jackson M, Smith L, Jenner P, Marsden CD (1995) Chronic L-DOPA administration induces dyskinesias in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Mov Disord* 10: 731-740.
- Pedersen V, Schmidt WJ (2000b) Immediate early gene expression in rat basal ganglia after destruction of the dopaminergic system. *Neurotox Res* 2: 23-28.
- Pedersen V, Schmidt WJ (2000a) The neuroprotectant properties of glutamate antagonists and antigliutamatergic drugs. *Neurotox Res* 2: 179-204.
- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ (1994) The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *J Neurosci* 14: 6102-6120.
- Piallat B, Benazzouz A, Benabid AL (1996) Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *Eur J Neurosci* 8: 1408-1414.

- Piech-Dumas KM, Tank AW (1999) CREB mediates the cAMP-responsiveness of the tyrosine hydroxylase gene: use of an antisense RNA strategy to produce CREB-deficient PC12 cell lines. *Mol Brain Res* 70: 219-230.
- Pinna A, Morelli M, Drukarch B, Stoof JC (1997) Priming of 6-hydroxydopamine-lesioned rats with L-DOPA or quinpirole results in an increase in dopamine D1 receptor-dependent cyclic AMP production in striatal tissue. *Eur J Pharmacol* 331: 23-26.
- Pollack AE, Strauss JB (1999) Time dependence and role of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the priming of D2-mediated rotational behavior and striatal Fos expression in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 827: 160-168.
- Pollack AE, Turgeon SM, Fink JS (1997) Apomorphine priming alters the response of striatal outflow pathways to D2 agonist stimulation in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience* 79: 79-93.
- Pollak P, Benabid AL, Limousin P, Benazzouz A (1997) Chronic intracerebral stimulation in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 74: 213-220.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047.
- Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson L, V, Donaldson D, Togasaki DM (1995) Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 67: 631-647.
- Przuntek H (1988) Aktuelle Parkinson-Therapie: Anwendung des Monoaminoxidase-B--Hemmers Deprenyl und subkutane Applikation des Dopaminagonisten Lisurid. *Aktuelle Neurol* 15: 42-44.
- Przuntek H, Welzel D, Gerlach M, Blumner E, Danielczyk W, Kaiser HJ, Kraus PH, Letzel H, Riederer P, Uberla K (1996) Early institution of bromocriptine in Parkinson's disease inhibits the emergence of levodopa-associated motor side effects. Long-term results of the PRADO study. *J Neural Transm* 103: 699-715.
- Radulovic J, Blank T, Nijholt I, Kammermeier J, Spiess J (2000) In vivo NMDA/dopamine interaction resulting in Fos production in the limbic system and basal ganglia of the mouse brain. *Mol Brain Res* 75: 271-280.
- Rajakumar N, Rushlow W, Rajakumar B, Naus CC, Stoessl AJ, Flumerfelt BA (1997) Effects of graft-derived dopaminergic innervation on the target neurons of patch and matrix compartments of the striatum. *Neuroscience* 76: 1173-1185.
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De-Deyn PP, Clarke CE, Lang AE (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *N Engl J Med* 342: 1484-1491.
- Reader TA, Dewar KM (1999) Effects of denervation and hyperinnervation on dopamine and serotonin systems in the rat neostriatum: implications for human Parkinson's disease. *Neurochem Int* 34: 1-21.
- Rigby M, Le Bourdelles B, Heavens RP, Kelly S, Smith D, Butler A, Hammans R, Hills R, Xuereb JH, Hill RG, Whiting PJ, Sirinathsinghji DJ (1996) The messenger RNAs for the N-methyl-D-aspartate receptor subunits show region-specific expression of different subunit composition in the human brain. *Neuroscience* 73: 429-447.
- Rinne UK (1989) Lisuride, a dopamine agonist in the treatment of early Parkinson's disease. *Neurology* 39: 336-339.
- Rinne UK (1999) Combination therapy with lisuride and L-dopa in the early stages of Parkinson's disease decreases and delays the development of motor fluctuations. Long-term study over 10 years in comparison with L-dopa monotherapy. *Nervenarzt [Suppl]* 70: S19-S25.

- Rinne UK, Bracco F, Chouza C, Dupont E, Gershanik O, Marti MJ, Montastruc JL, Marsden CD, Dubini A, Orlando N, Grimaldi R (1997) Cabergoline in the treatment of early Parkinson's disease: results of the first year of treatment in a double-blind comparison of cabergoline and levodopa. The PKDS009 collaborative study group. *Neurology* 48: 363-368.
- Robertson HA (1992) Dopamine interactions: some implications for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 15: 201-205.
- Robinson TE, Wishaw IQ (1988) Normalization of extracellular dopamine in striatum following recovery from a partial unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra: a microdialysis study in freely moving rats. *Brain Res* 450: 209-224.
- Rodríguez-Puertas R, Herrera-Marschitz M, Koistinaho J, Hökfelt T (1999) Dopamine D1 receptor modulation of glutamate receptor messenger RNA levels in the neocortex and neostriatum of unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience* 89: 781-797.
- Rose S, Nomoto M, Jenner P, Marsden CD (1989) Transient depletion of nucleus accumbens dopamine content may contribute to initial akinesia induced by MPTP in common marmosets. *Biochem Pharmacol* 38: 3677-3681.
- Rosenblad C, Gronborg M, Hansen C, Blom N, Meyer M, Johansen J, Dago L, Kirik D, Patel UA, Lundberg C, Trono D, Björklund A, Johansen TE (2000a) In vivo protection of nigral dopamine neurons by lentiviral gene transfer of the novel GDNF-family member neublastin/artemin. *Mol Cell Neurosci* 15: 199-214.
- Rosenblad C, Kirik D, Björklund A (2000b) Sequential administration of GDNF into the substantia nigra and striatum promotes dopamine neuron survival and axonal sprouting but not striatal reinnervation or functional recovery in the partial 6-OHDA lesion model. *Exp Neurol* 161: 503-516.
- Rosenblad C, Kirik D, Devaux B, Moffat B, Phillips HS, Björklund A (1999) Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Eur J Neurosci* 11: 1554-1566.
- Rothman SM, Olney JW (1987) Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci* 10: 299-302.
- Ruskin DN, Marshall JF (1997) Differing influences of dopamine agonists and antagonists on Fos expression in identified populations of globus pallidus neurons. *Neuroscience* 81: 79-92.
- Saha AR, Ninkina NN, Hanger DP, Anderton BH, Davies AM, Buchman VL (2000) Induction of neuronal death by alpha-synuclein. *Eur J Neurosci* 12: 3073-3077.
- Salamone JD, Mayorga AJ, Trevitt JT, Cousins MS, Conlan A, Nawab A (1998) Tremulous jaw movement in rats: a model of Parkinsonian tremor. *Prog Neurobiol* 56: 591-611.
- Sanberg PR, Giordano M, Bunsey MD, Norman AB (1988) The catalepsy test: its ups and downs. *Behav Neurosci* 102: 748-759.
- Sanghera MK, Manaye K, McMahon A, Sonsalla PK, German DC (1997) Dopamine transporter mRNA levels are high in midbrain neurons vulnerable to MPTP. *Neuroreport* 8: 3327-3331.
- Santiago M, Venero JL, Machado A, Cano J (1992) In vivo protection of striatum from MPP⁺ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Brain Res* 586: 203-207.
- Saper CB (1996) Any way you cut it: a new journal poliocy for the use of unbiased counting methods. *J Comp Neurol* 364: 5-5.
- Saporito MS, Thomas BA, Scott RW (2000) MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. *J Neurochem* 75: 1200-1208.
- Sato F, Lavallée P, Lévesque M, Parent A (2000) Single-axon tracing study of neurons of the external segment of the globus pallidus in primate. *J Comp Neurol* 417: 17-31.
- Sauer H, Oertel WH (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59: 401-415.

- Scatton B (1994) Excitatory amino acid receptor antagonists: a novel treatment for ischemic cerebrovascular diseases. *Life Sci* 55: 2115-2124.
- Scheel-Krüger J (1983) The GABA receptor and animal behavior. In: *The GABA receptors* (Enna SJ, ed), pp 215-256. Clifton N.J.: The Humana Press.
- Schmidt WJ (1986) Intrastratial injection of *DL* -2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP-5) induces sniffing streotypy that is antagonized by haloperidole and clozapine. *Psychopharmacology* 90: 123-130.
- Schmidt WJ (1994) Behavioural effects of NMDA-receptor antagonists. *J Neural Transm [Suppl]* 43: 63-69.
- Schmidt WJ (1995) Balance of transmitter activities in the basal ganglia loops. *J Neural Transm* 46: 67-76.
- Schmidt WJ (2000) Zur Verhaltensbiologie der Parkinson-Krankheit. *Neuroforum* 6: 229-234.
- Schmidt WJ, Bubser M, Hauber W (1992) Behavioral pharmacology of glutamate in the basal ganglia. *J Neural Transm* 38: 65-89.
- Schmidt WJ, Kretschmer BD (1997) Behavioral pharmacology of glutamate receptors in the basal ganglia. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 381-392.
- Schmidt WJ, Tzschentke TM, Kretschmer BD (1999) State-dependent blockade of haloperidol-induced sensitization of catalepsy by MK-801. *Eur J Neurosci* 11: 1-5.
- Schmidt WJ, Zadow B, Kretschmer BD, Hauber W (1991) Anticataleptic potencies of glutamate-antagonists. *Amin Acids* 1: 225-237.
- Schuller JJ, Marshall JF (2000) Acute immediate-early gene response to 6-hydroxydopamine infusions into the medial forebrain bundle. *Neuroscience* 96: 51-58.
- Schulman H, Hyman SE (1999) Intracellular Signaling. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds), pp 269-316. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.
- Schulz JB, Dichgans J (1999) Molecular pathogenesis of movement disorders: are protein aggregates a common link in neuronal degeneration? *Curr Opin Neurol* 112: 433-439.
- Schwartz R, Huston JP (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50: 275-331.
- Schwarzschild MA, Cole RL, Hyman SE (1997) Glutamate, but not dopamine, stimulates stress-activated protein kinase and AP-1-mediated transcription in striatal neurons. *J Neurosci* 17: 3455-3466.
- Schwarzschild MA, Cole RL, Meyers MA, Hyman SE (1999) Contrasting calcium dependencies of SAPK and ERK activations by glutamate in cultured striatal neurons. *J Neurochem* 72: 2248-2255.
- Scibilia RJ, Lachowicz JE, Kilts CD (1992) Topographic nonoverlapping distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain. *Synapse* 11: 146-154.
- Sealfon SC, Olanow CW (2000) Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends Neurosci [Suppl]* 23: S34-S40.
- Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290: 213-242.
- Sharp FR, Butman M, Koistinaho J, Aardalen K, Nakki R, Massa SM, Swanson RA, Sagar SM (1994) Phencyclidine induction of the *hsp 70* stress gene in injured pyramidal neurons is mediated via multiple receptors and voltage gated calcium channels. *Neuroscience* 62: 1079-1092.
- Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13: 259-265.

- Smith Y, Kieval JZ (2000) Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. Trends Neurosci [Suppl] 23: S28-S33.
- Smith Y, Parent A (1988) Neurons of the subthalamic nucleus in primates display glutamate but not GABA immunoreactivity. Brain Res 453: 353-356.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. Nature 347: 146-151.
- Song DD, Haber SN (2000) Striatal responses to partial dopaminergic lesion: evidence for compensatory sprouting. J Neurosci 20: 5102-5114.
- Sonnenberg JL, Rauscher FJ, Morgan JI, Curran T (1989) Regulation of proenkephalin by Fos and Jun. Science 246: 1622-1625.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature 388: 839-840.
- Srinivasan A, Roth KA, Sayers RO, Shindler KS, Wong AM, Fritz LC, Tomaselli KJ (1998) In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system. Cell Death Differ 5: 1004-1016.
- Srivastava R, Brouillet E, Beal MF, Storey E, Hyman BT (1993) Blockade of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) nigral toxicity in the rat by prior decortication or MK-801 treatment: a stereological estimate of neuronal loss. Neurobiol Aging 14: 295-301.
- Standaert DG, Testa CM, Young AB, Penney JB, Jr. (1994) Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. J Comp Neurol 343: 1-16.
- Starr MS, Starr BS, Kaur S (1997) Stimulation of basal and L-DOPA-induced motor activity by glutamate antagonists in animal models of Parkinson's disease. Neurosci Biobehav Rev 21: 437-446.
- Steece-Collier K, Chambers LK, Jaw-Tsai SS, Menniti FS, Greenamyre JT (2000) Antiparkinsonian action of CP-101,606, an antagonist of NR2B subunit-containing N-methyl-D-aspartate receptors. Exp Neurol 163: 239-243.
- Stocchi F, Brusa L (2000) Cognition and emotion in different stages and subtypes of Parkinson's disease. J Neurol [Suppl] 247: 114-121.
- Storch A, Burkhardt K, Ludolph AC, Schwarz J (2000) Protective effects of riluzole on dopamine neurons: involvement of oxidative stress and cellular energy metabolism. J Neurochem 75: 2259-2269.
- Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses *in vitro*. J Neurosci 18: 4588-4602.
- Tahar AH, Gregoire L, Bangassoro E, Bedard PJ (2000) Sustained cabergoline treatment reverses levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. Clin Neuropharmacol 23: 195-202.
- Takada M, Matsumura M, Kojima J, Yamaji Y, Inase M, Tokuno H, Nambu A, Imai H (2000) Protection against dopaminergic nigrostriatal cell death by excitatory input ablation. Eur J Neurosci 12: 1771-1780.
- Takashima H, Tsujihata M, Kishikawa M, Freed WJ (1999) Bromocriptine protects dopaminergic neurons from levodopa-induced toxicity by stimulating D(2)receptors. Exp Neurol 159: 98-104.
- Tan Y, Williams ES, Zahm DS (1999) Calbindin-D 28kD immunofluorescence in ventral mesencephalic neurons labeled following injections of Fluoro-Gold in nucleus accumbens subterritories: inverse relationship relative to known neurotoxin vulnerabilities. Brain Res 844: 67-77.
- Tatton NA, Kish SJ (1997) In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. Neuroscience 77: 1037-1048.

- Tatton NA, Maclean FA, Tatton WG, Perl DP, Olanow CW (1998) A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease. *Ann Neurol [Suppl]* 44: S142-S148.
- Tipton KF, Singer TP (1993) Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem* 61: 1191-1206.
- Trejo J, Massamiri T, Deng T, Dewji NN, Bayney RM, Brown JH (1994) A direct role for protein kinase C and the transcription factor Jun/AP-1 in the regulation of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem* 269: 21682-21690.
- Tremblay M, Salin P, Soghomonian J-J (1995) Effect of 6-OHDA lesions on striatal mRNA levels encoding for glutamate receptor subunits. *Neuroreport* 6: 2225-2229.
- Tsuboi K, Kimber TA, Shults CW (2000) Calretinin-containing axons and neurons are resistant to an intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion. *Brain Res* 866: 55-64.
- Turjanski N, Lees AJ, Brooks DJ (1997) In vivo studies on striatal dopamine D1 and D2 site binding in L-dopa-treated parkinson's disease patients with and without dyskinesias. *Neurology* 49: 717-723.
- Turner BH, Wilson JS, McKenzie JC, Richtand N (1988) MPTP produces a pattern of nigrostriatal degeneration which coincides with the mosaic organization of the caudate nucleus. *Brain Res* 473: 60-64.
- Turski L, Bressler K, Rettig KJ, Löschmann PA, Wachtel H (1991) Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 349: 414-418.
- Tzschentke TM, Schmidt WJ (1998) Does the noncompetitive NMDA receptor antagonist dizocilpine (MK801) really block behavioural sensitization associated with repeated drug administration? *Trends Pharmacol Sci* 19: 447-451.
- Ungerstedt U (1968) 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5: 107-110.
- Ungerstedt U (1971a) Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367: 95-122.
- Ungerstedt U (1971b) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367: 69-93.
- Uretsky NJ, Iversen LL (1970) Effects of 6-hydroxydopamine on catecholamine containing neurones in the rat brain. *J Neurochem* 17: 269-278.
- Uziel A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408: 199-203.
- Vaccarino FM, Hayward MD, Nestler EJ, Duman RS, Tallman JF (1992) Differential induction of immediate early genes by excitatory amino acid receptor types in primary cultures of cortical and striatal neurons. *Mol Brain Res* 12: 233-241.
- Vallone D, Pellecchia MT, Morelli M, Verde P, Di Chiara G, Barone P (1997) Behavioural sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats is related to compositional changes of the AP-1 transcription factor: evidence for induction of FosB- and JunD-related proteins. *Mol Brain Res* 52: 307-317.
- Vanderluit JL, McPhail LT, Fernandes KJL, McBride CB, Huguenot C, Roy S, Robertson GS, Nicholson DW, Tetzlaff W (2000) Caspase-3 is activated following axotomy of neonatal facial motoneurons and caspase-3 gene deletion delays axotomy-induced cell death in rodents. *Eur J Neurosci* 12: 3469-3480.
- Verhagen Metman L, Del Dotto P, van den MP, Fang J, Mouradian MM, Chase TN (1998) Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology* 50: 1323-1326.
- Vila M, Levy R, Herrero MT, Faucheux B, Obeso JA, Agid Y, Hirsch EC (1996) Metabolic activity of the basal ganglia in parkinsonian syndromes in human and non-human primates: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Neuroscience* 71: 903-912.

- Vila M, Vukosavic S, Jackson L, V, Neystat M, Jakowec M, Przedborski S (2000) α -synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the Parkinsonian toxin MPTP. *J Neurochem* 74: 721-729.
- Vu TQ, Ling ZD, Ma SY, Robie HC, Tong CW, Chen EY, Lipton JW, Carvey PM (2000) Pramipexole attenuates the dopaminergic cell loss induced by intraventricular 6-hydroxydopamine. *J Neural Transm* 107: 159-176.
- Wamsley JK, Gehlert DR, Filloux FM, Dawson TM (1989) Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 2: 119-137.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1993) Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *J Comp Neurol* 338: 377-390.
- Waxham MN (1999) Neurotransmitter Receptors. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds), pp 235-267. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1859-1863.
- Wernyj RP, Mattson MP, Christakos S (1999) Expression of calbindin-D-28k in C6 glial cells stabilizes intracellular calcium levels and protects against apoptosis induced by calcium ionophore and amyloid beta-peptide. *Mol Brain Res* 64: 69-79.
- West MJ, Gundersen HJG (1990) Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* 296: 1-22.
- Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44: 851-859.
- Williams RW, Rakic P (1988) Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 278: 344-352.
- Wilson CJ, Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194: 599-615.
- Wirtshafter D, Asin KE (1999) Unilateral dopamine depletion paradoxically enhances amphetamine-induced Fos expression in basal ganglia output structures. *Brain Res* 824: 81-88.
- Wüllner U, Kornhuber J, Weller M, Schulz JB, Löschnann PA, Riederer P, Klockgether T (1999) Cell death and apoptosis regulating proteins in Parkinson's disease - a cautionary note. *Acta Neuropathol* 97: 408-412.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
- Yahr MD, Duvoisin RC, Shear MJ, Barrett RE, Hoehn MM (1969) Treatment of parkinsonism with levodopa. *Arch Neurol* 21: 343-354.
- Yamakura T, Shimoji K (1999) Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59: 279-298.
- Yuan JY, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-809.
- Yung KK (1998) Localization of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in distinct neuronal elements of the rat substantia nigra. *Neurochem Int* 33: 313-326.
- Yung KK, Bolam JP, Smith AD, Hersch SM, Ciliax BJ, Levey AI (1995) Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* 65: 709-730.
- Zahm DS (1991) Compartments in rat dorsal and ventral striatum revealed following injection of 6-hydroxydopamine into the ventral mesencephalon. *Brain Res* 552: 164-169.

- Zahm DS (2000) An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 85-100.
- Zeevalk GD, Nicklas WJ (1990) Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J Pharmacol Exp Therap* 253: 1285-1292.
- Zeng B-Y, Pearce RKB, MacKenzie GM, Jenner P (2000) Alterations in preproenkephalin and adenosine-2a receptor mRNA, but not preprotachykinin mRNA correlate with occurrence of dyskinesia in normal monkeys chronically treated with L-DOPA. *Eur J Neurosci* 12: 1096-1104.
- Zhou FC, Bledsoe S, Murphy J (1991) Serotonergic sprouting is induced by dopamine-lesion in substantia nigra of adult rat brain. *Brain Res* 556: 108-116.
- Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM (1990) Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci* 13: 290-296.
- Zilles K, Wree A (1994) Cortex: Areal and laminar structure. In: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed), pp 649-685. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.
- Ziólkowska B, Höllt V (1993) The NMDA receptor antagonist MK-801 markedly reduces the induction of c-fos gene by haloperidol in the mouse striatum. *Neurosci Lett* 156: 39-42.
- Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm A-C, Bickford PC (2000) Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *J Comp Neurol* 427: 440-454.
- Zweig RM, Jankel WR, Hedreen JC, Mayeux R, Price DL (1989) The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 26: 41-46.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Vera Pedersen
geb. am 10. Juli 1970 in Freiburg
ledig

Schule

1976 – 1980 Tulla Grundschule, Freiburg
1980 – 1989 Droste-Hülshoff-Gymnasium, Freiburg
1989 Abitur

Studium

1990 Studium der Geschichte / Philosophie (Magister) an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
1990 – 1993 Grundstudium der Biologie (Diplom) an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
1992 Diplom-Vorprüfung
1993 – 1997 Hauptstudium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
Hauptfach: Zoophysiologie
Nebenfächer: Pflanzenphysiologie, Biochemie, Pharmazeutische Biologie
1996 – 1997 Diplomarbeit in der Abteilung für Neuropharmakologie des Zoologischen Instituts der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen: „Räumliches und zeitliches Expressionsmuster von c-Fos und c-Jun im ZNS der Ratte nach 6-OHDA-Läsion und Reserpin“

Promotion

1997 – 2000 Promotionsarbeit über das Thema „Verhaltenspharmakologische und histologische Charakterisierung der Funktion von Dopamin und Glutamat bei der ‚nigralen und ‚extranigralen‘ Pathologie in einem Tiermodell der Parkinson-Krankheit“ in der Abteilung für Neuropharmakologie des Zoologischen Instituts der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. W.J. Schmidt.
seit 1997 Mitarbeiterin des Sonderforschungsbereichs 430 der Deutschen Forschungsgemeinschaft („Zelluläre Mechanismen sensorischer Prozesse und neuronaler Interaktionen“).

Akademische Lehrer

Prof. Dr. R. Apfelbach

Prof. Dr. K.-G. Collatz

Prof. Dr. M. Gerlach

Prof. Dr. H. Erkert

PD Dr. K. Großmann

Prof. Dr. B. Hamprecht

Prof. Dr. R. Hausmann

Prof. Dr. R. Hertel

Prof. Dr. G. Köhler

Prof. Dr. M. Koch

PD Dr. B.K. Müller

Prof. Dr. phil. nat. H. Ninnemann

Prof. em Dr. E. Reinhard

Prof. Dr. P. Riederer

Prof. Dr. S. Rossel

Prof Dr. W.J. Schmidt

Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

Prof. Dr. H.U. Seitz

Prof. Dr. A.E. Sippel

Prof. em Dr. P. Sitte

Prof. Dr. K. Vogt