

AUS DEM INSTITUT FÜR ANATOMIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. ANDREAS WREE

DIE AUSWIRKUNG EINER INTRASTRIATALEN
BOTULINUMNEUROTOXIN-A-INJEKTION AUF DIE DICHTEN VON
GLUTAMATREZEPTOREN IN HEMIPARKINSONRATTEN

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON
FRIEDERIKE SOPHIE VOLLMER
AUS FRANKFURT AM MAIN
ROSTOCK, 07. JULI 2017

DEKAN: PROF. DR. MED. UNIV. EMIL C. REISINGER

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. MED. ANDREAS WREE

EINRICHTUNG: INSTITUT FÜR ANATOMIE, UNIVERSITÄT ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: PROF. DR. MED. DR. MED. H.C. KARL ZILLES

EINRICHTUNG: INSTITUT FÜR NEUROWISSENSCHAFTEN UND MEDIZIN
FORSCHUNGSZENTRUMS JÜLICH

DRITTGUTACHTER: PD DR. MED. CHRISTOPH KAMM

EINRICHTUNG: KLINIK UND POLIKLINIK FÜR NEUROLOGIE, UNIVERSITÄT ROSTOCK

DATUM DER EINREICHUNG: 07. JULI 2017

DATUM DER VERTEIDIGUNG: 18. APRIL 2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Morbus Parkinson (idiopathisches Parkinsonsyndrom)	1
1.1.1 Einleitung	1
1.1.2 Klinik	2
1.1.3 Pathogenese	2
1.1.4 Diagnostik	4
1.1.5 Therapie	4
1.2 Basalganglien	6
1.2.1 Einleitung	6
1.2.2 Striatum	7
1.2.3 Globus pallidus	8
1.2.4 Substantia nigra	8
1.2.5 Nucleus subthalamicus	9
1.2.6 Basalganglienschleife	9
1.2.7 Rolle der Basalganglien in der Pathogenese des Morbus Parkinson	11
1.3 Glutamatrezeptoren	12
1.3.1 Einleitung	12
1.3.2 AMPA-Rezeptoren	14
1.3.3 Kainat-Rezeptoren	16
1.3.4 NMDA-Rezeptoren	17
1.3.5 mGlu2/3-Rezeptoren	20
1.4 Quantitative Rezeptorautoradiographie	21
1.5 6-OHDA-Modell der Ratte (Hemiparkinsonratte)	22
1.6 Botulinumneurotoxine	24
1.6.1 Eigenschaften	24
1.6.2 Einsatz in der Medizin	25
1.6.3 Potentielle Anwendung bei Morbus Parkinson	27
1.7 Fragestellung der Arbeit	28

2	Material und Methoden.....	29
2.1	Tiere	29
2.2	Narkose der Tiere	29
2.3	Einteilung der Tiere in fünf Versuchsgruppen.....	29
2.4	Unilaterale Läsion des medialen Vorderhirnbündels mit 6-OHDA.....	29
2.5	Intrazerebrale Applikation von Botulinumneurotoxin-A.....	30
2.6	Tötung der Tiere und Fixierung der Gehirne	31
2.7	Aufarbeitung der Gehirne.....	31
2.8	Quantitative Rezeptorautoradiographie	33
2.9	Auswertung der Rezeptorautoradiogramme mit MCID	34
2.10	Ermittlung der Rezeptordichte	45
2.11	Statistische Auswertung.....	46
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Einleitung	47
3.2	AMPA-Rezeptoren	48
3.3	Kainat-Rezeptoren	53
3.4	NMDA-Rezeptoren.....	58
3.5	mGlu2/3-Rezeptoren.....	62
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	67
4	Diskussion	68
4.1	Methodenkritik.....	68
4.2	Ergebnisdiskussion	69
4.2.1	Veränderungen der AMPA-Rezeptoren.....	69
4.2.2	Veränderungen der Kainat-Rezeptoren.....	72
4.2.3	Veränderungen der NMDA-Rezeptoren	75
4.2.4	Veränderungen der mGlu2/3-Rezeptoren	79
4.3	Zusammenfassung und Ausblick	82
5	Zusammenfassung	85
6	Thesen.....	86
7	Literaturverzeichnis	87
	Anhang	VII
	Selbständigkeitserklärung	XVI
	Danksagung	XVIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verschaltung der Basalganglien	10
Abbildung 2: Aufbau der Glutamaterezeptoren	13
Abbildung 3: Sitz und Signalweg der metabotropen Glutamaterezeptoren	13
Abbildung 4: Verteilung der AMPA- und Kainat-Rezeptoren im Striatum	15
Abbildung 5: Aufbau des NMDA-Rezeptors	19
Abbildung 6: Verteilung der NMDA- und mGlu2/3-Rezeptoren im Striatum	21
Abbildung 7: Injektionsstellen von BoNT/A im Striatum der Ratte.	30
Abbildung 8: Kartierung der Schnittebenen nach Paxinos und Watson	32
Abbildung 9: Kalibrierungskurve in MCID	35
Abbildung 10: Bildserie von rostral nach kaudal markiert mit [³ H]AMPA	37
Abbildung 11: Bildserie von rostral nach kaudal markiert mit [³ H]Kainat	38
Abbildung 12: Bildserie von rostral nach kaudal markiert mit [³ H]LY341	39
Abbildung 13: Bildserie von rostral nach kaudal markiert mit [³ H]MK801	40
Abbildung 14: Darstellung der in MCID angelegten Konturlinie	41
Abbildung 15: Inkomplette Messung des Striatums aufgrund schlechter Bildqualität	42
Abbildung 16: Inkomplette Messung des Striatums aufgrund Materialüberlagerung	43
Abbildung 17: Inkomplette Messung des Striatums aufgrund eines Artefaktes	44
Abbildung 18: Rezeptordichten der Glutamaterezeptoren im Striatum	47
Abbildung 19: AMPA-Rezeptordichten der vier Versuchsgruppen	48
Abbildung 20: Relative AMPA-Rezeptordichten der einzelnen Versuchstiere	49
Abbildung 21: AMPA-Rezeptordichten der 6-OHDA-läsionierten Tiere	50
Abbildung 22: AMPA-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Tiere	51
Abbildung 23: AMPA-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten	51
Abbildung 24: AMPA-Rezeptordichten der einzelnen Schnittebenen des Striatums	52
Abbildung 25: Vergleich der AMPA-Rezeptordichten einzelner Versuchsgruppen	53
Abbildung 26: Kainat-Rezeptordichten der vier Versuchsgruppen	53
Abbildung 27: Relative Kainat-Rezeptordichten der einzelnen Versuchstiere	54
Abbildung 28: Kainat-Rezeptordichten der 6-OHDA-läsionierten Tiere	55
Abbildung 29: Kainat-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Tiere	55
Abbildung 30: Kainat-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten	56
Abbildung 31: Kainat-Rezeptordichten der einzelnen Schnittebenen des Striatums	57
Abbildung 32: Vergleich der Kainat-Rezeptordichten einzelner Versuchsgruppen	57
Abbildung 33: NMDA-Rezeptordichten der vier Versuchsgruppen	58
Abbildung 34: Relative NMDA-Rezeptordichten der einzelnen Versuchstiere	59
Abbildung 35: NMDA-Rezeptordichten der 6-OHDA-läsionierten Tiere	60
Abbildung 36: NMDA-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Tiere	60
Abbildung 37: NMDA-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten	61
Abbildung 38: NMDA-Rezeptordichten der einzelnen Schnittebenen des Striatums	61
Abbildung 39: Vergleich der NMDA-Rezeptordichten einzelner Versuchsgruppen	62

Abbildung 40: mGlu2/3-Rezeptordichten der vier Versuchsgruppen.....	63
Abbildung 41: Relative mGlu2/3-Rezeptordichten der einzelnen Versuchstiere	63
Abbildung 42: mGlu2/3-Rezeptordichten der 6-OHDA-läsionierten Tiere	64
Abbildung 43: mGlu2/3-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Tiere	65
Abbildung 44: mGlu2/3-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten	65
Abbildung 45: mGlu2/3-Rezeptordichten der einzelnen Schnittebenen des Striatums	66
Abbildung 46: Vergleich der mGlu2/3-Rezeptordichten einzelner Versuchsgruppen.....	66
Abbildung 47: Steuerung des NMDA-Rezeptor-Transport durch SNAP-25?	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: AMPA-Rezeptordichten im Striatum	70
Tabelle 2: Kainat-Rezeptordichten im Striatum	74
Tabelle 3: NMDA-Rezeptordichten im Striatum.....	76
Tabelle 4: mGlu2/3-Rezeptordichten im Striatum.....	80
Tabelle 5: Tierplan der fünf Versuchsgruppen.....	VII
Tabelle 6: Rezeptor-spezifische Inkubationsbedingungen	VIII
Tabelle 7: Expositionszeiten der verschiedenen Liganden.....	IX
Tabelle 8: Liganden-spezifische Konstanten.....	IX

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α - <u>a</u> mino-3-hydroxy-5- <u>m</u> ethyl-4-isoxazole <u>p</u> ropionic <u>a</u> cid
AC	<u>A</u> denylat <u>c</u> yclase
ACh	<u>A</u> cetyl <u>ch</u> olin
BoNT	<u>B</u> otulinum <u>n</u> euro <u>t</u> oxin(e)
COMT	<u>C</u> atechol- <u>O</u> - <u>M</u> ethyl <u>t</u> ransferase
CPu	Nucleus <u>c</u> audatus- <u>P</u> utamen
D1/2	<u>D</u> opamin <u>1/2</u>
DAG	<u>D</u> iacyl <u>g</u> lycerol
DAT	<u>D</u> op <u>a</u> min <u>t</u> ransporter
DJ-1	Protein Deglycase DJ-1
EPSP	<u>E</u> xzitatorisches <u>p</u> ost <u>s</u> ynaptisches <u>P</u> otential
FDG-PET	<u>F</u> luor <u>d</u> eoxy <u>g</u> lukose- <u>P</u> ositronen <u>e</u> mission <u>s</u> t <u>o</u> mographie
GABA	<u>G</u> amma- <u>A</u> mino <u>b</u> utyric <u>A</u> cid
GBA	<u>G</u> lucocere <u>b</u> rosid <u>a</u> se
GP	<u>G</u> lobus <u>p</u> allidus
GPI	<u>G</u> lobus <u>p</u> allidus <u>i</u> nternus
GPe	<u>G</u> lobus <u>p</u> allidus <u>e</u> xternus
IP3	<u>I</u> nositol <u>t</u> ri <u>p</u> hosphat
KSCN	Kaliumthiocyanat
L-DOPA	<u>L</u> -3,4- <u>D</u> ihydroxyphenyl <u>a</u> lanin (Levodopa)
LY341,495	(α S)- α -amino- α -[(1S,2S)-2-carboxycyclopropyl]-9H-xanthene-9-propanoic-acid
MAO-B	<u>M</u> onoamino <u>o</u> xidase- <u>B</u>
MFB	<u>M</u> ediales Vorderhirn (forebrain) <u>B</u> ündel
mGlu-Rezeptoren	<u>m</u> etabotrope <u>G</u> lutamat <u>r</u> ezeptoren
MK-801	Dizocilpin

MPTP	1- <u>M</u> ethyl-4- <u>p</u> henyl-1,2,3,6- <u>t</u> etrahydro <u>p</u> yrudin
MSN	<u>M</u> edium <u>s</u> piny <u>n</u> euron
MW area RD	Mittlere flächengewichtete Rezeptordichte
Neto 1/2	<u>N</u> europilin und <u>t</u> olloid-like protein 1 /2
NMDA	<u>N</u> - <u>M</u> ethyl- <u>D</u> - <u>A</u> spartat
PCP	<u>P</u> henyl <u>c</u> yclohexyl <u>p</u> iperidin (Phencyclidin)
PINK1	<u>P</u> TEN- <u>i</u> nduced putative <u>k</u> inase <u>1</u>
PKC	<u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>C</u>
PLC	<u>P</u> hospholipase <u>C</u>
PSD-95	Protein <u>95</u> der <u>P</u> ost <u>s</u> ynaptischen <u>D</u> ichte
RD	<u>R</u> ezeptor <u>d</u> ichte
SNCA	<u>S</u> ynuclein <u>a</u> lpha
SN	<u>S</u> ubstantia <u>n</u> igra
SNpc	<u>S</u> ubstantia <u>n</u> igra <u>p</u> ars <u>c</u> ompacta
SNpr	<u>S</u> ubstantia <u>n</u> igra <u>p</u> ars <u>r</u> eticulata
SNAP-25	<u>S</u> ynaptosom- <u>a</u> ssoziiertes <u>P</u> rotein- <u>25</u> kDa
SNARE	<u>s</u> oluble <u>N</u> -ethylmaleimide-sensitive factor <u>a</u> ttachment protein <u>r</u> eceptor
STN	Nucleus subthalamicus (<u>s</u> ub <u>t</u> halamic <u>n</u> ucleus)
ZNS	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervens <u>s</u> ystem
6-OHDA	<u>6</u> - <u>H</u> ydroxydopamin

1 Einleitung

1.1 Morbus Parkinson (idiopathisches Parkinsonsyndrom)

1.1.1 Einleitung

Der Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung des Menschen und betrifft 2-3 % der über 65-Jährigen. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einem Anstieg der Prävalenz. Im Rahmen des demographischen Wandels wird daher erwartet, dass sich die Anzahl der Parkinson-Patienten bis zum Jahr 2030 im Vergleich zum Jahr 2005 verdoppeln wird (Poewe et al. 2017; Ascherio und Schwarzschild 2016; Dorsey et al. 2007).

Der Morbus Parkinson stellt eines von vier unterschiedlichen Parkinsonsyndromen dar. Neben dieser idiopathischen Form unterscheidet man ein monogen vererbtes (familiäres) Parkinsonsyndrom, atypische Parkinsonsyndrome im Rahmen von anderen neurodegenerativen Erkrankungen, sowie symptomatische Parkinsonsyndrome (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) 2016).

Im Verlauf der letzten 50 Jahre gab es mehrere Entdeckungen, die wesentlich für ein fortschreitendes Verständnis der Krankheitsursache und die Entwicklung von neuen Therapien waren. Dazu zählt zum Beispiel die erstmalige Beschreibung eines Verlustes dopaminerger Afferenzen im Striatum von Parkinsonpatienten und die darauf folgende Einführung von L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) (Cotzias et al. 1969; EHRINGER und HORNYKIEWICZ 1960). Einen weiteren Therapieerfolg brachte die Einführung der Tiefen Hirnstimulation (siehe (Schulz et al. 2011)).

Trotz dieser Fortschritte ist der Morbus Parkinson auch heutzutage noch Gegenstand der aktuellen Forschung, denn auch 200 Jahre nach der Erstbeschreibung der Erkrankung durch James Parkinson in seinem Buch „An Essay on the Shaking Palsy“, bleibt der Morbus Parkinson eine chronisch fortschreitende Erkrankung ohne kurative Therapiemöglichkeit (Poewe et al. 2017). Intensive Forschung und neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Pathogenese lassen auf eine zukünftige kurative Therapie hoffen (Oertel 2017). In Anbetracht der erwarteten Zunahme von Parkinson-Patienten, widmen sich aktuelle Forschungen zudem der Suche nach Biomarkern und der Möglichkeit gefährdete Patienten, anhand von Screening-Verfahren, zukünftig schon im präsymptomatischen Stadium zu erkennen (Doppler et al. 2017; Cersosimo 2015).

1.1.2 Klinik

Ursprünglich wurde der Morbus Parkinson als rein motorische Erkrankung verstanden, die durch die Kardinalsymptome Bradykinese, Rigor und Tremor zu einer Beeinträchtigung der kontrollierten Bewegung führt (Blandini et al. 2000). Bradykinese beschreibt dabei eine allgemeine Verlangsamung der Motorik mit verzögerter Bewegungsinitiierung (Akinese) und Amplitudenabnahme von Zielbewegungen (Hypokinese). Unter Rigor versteht man eine geschwindigkeitsunabhängige Erhöhung des Muskeltonus. Der Tremor ist als Ruhetremor mit einer Frequenz von ca. 4-6 Hz definiert. Klassischerweise zeigt sich eine asymmetrische Symptomatik mit einseitigem Beginn (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) 2016). Im Verlauf der Krankheit kommt es außerdem zu Gangstörungen und posturaler Instabilität (Obeso et al. 2010). Durch vermehrte Beschreibung von nicht-motorischen Symptomen, hat sich der Morbus Parkinson zu einer Multisystemerkrankung entwickelt. Dabei können diese Symptome der motorischen Symptomatik vorausgehen. In den letzten Jahren wurden REM-Schlaf-Verhaltensstörungen sowie auch Hyposmien als wichtige Prädiktoren eines späteren Morbus Parkinson benannt. Sie sind als Risikofaktoren Teil der aktuellen Diagnosekriterien. Weitere wichtige Symptome betreffen das autonome Nervensystem. So kommt es zu orthostatischer Hypotension, Harninkontinenz, Obstipation, erektiler Dysfunktion und Hypersalivation. Mit zunehmender Krankheitsprogression kommt es zu kognitiver Beeinträchtigung bis hin zur Demenz. Zusätzlich leiden Parkinson-Patienten vermehrt an Depressionen und Schmerzen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) 2016). Da diese Symptome im Gegensatz zu den motorischen Symptomen schlecht auf die klassischen Therapiemöglichkeiten ansprechen, stellen sie die Hauptursache für fortschreitende Behinderung und Einschränkung der Lebensqualität dar (Obeso et al. 2010).

1.1.3 Pathogenese

Das idiopathische Parkinsonsyndrom gehört zur Gruppe der Synucleinopathien (Cersosimo 2015). Charakteristische pathologische Kennzeichen sind der Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) und das Auftreten von, als Lewy-Körperchen bezeichneten, Einschlusskörpern in Somata und Fortsätzen von Neuronen. Der Zelluntergang in der SNpc führt zu einer reduzierten dopaminergen Afferenz des Striatums. Diese Veränderungen im Striatum stellen den Hauptgrund für die motorischen Symptome des Morbus Parkinson dar (vgl. Kapitel 1.2.7). Die Hauptbestandteile der Lewy-Körperchen sind aggregiertes, unlösliches α -Synuclein sowie phosphorylierte Neurofilamente und Ubiquitin (Braak et al. 2003). α -Synuclein ist ein synaptisches Protein, das nach Ausbildung einer β -Faltblattstruktur verstärkt aggregiert.

Lewy-Körperchen findet man außer in der Substantia nigra (SN) auch in weiteren Hirnregionen. So zeigen nicht-dopaminerge Neurone des Hirnstamms, das olfaktorische Nervensystem und Teile des autonomen Nervensystems ebenfalls diese Pathologie. Untersuchungen über die Ausbreitung der Pathologie in Gehirnen von Parkinson-Patienten, führten zur Veröffentlichung der Braak-Stadien (Braak et al. 2003). Seitdem geht man von einer aufsteigenden Ausbreitung der α -Synuclein-Aggregate aus. Der Ausgangspunkt könnte in Neuronen des olfaktorischen und enterischen Systems liegen, als Endziel wird der Neokortex genannt. Dieses Modell erklärt den Verlauf der Erkrankung, beginnend mit Hyposmien und Obstipationen im Prodromalstadium, versetztem Auftreten der motorischen Symptome und zunehmender kognitiver Einschränkung mit Fortschritt der Erkrankung. Dabei scheint sich die Pathologie Prionen-artig auszubreiten (Olanow und Prusiner 2009). Gemeinsame Eigenschaften der betroffenen Neurone sind dabei lange, unmyelinisierte Axone und eine autonome Schrittmacheraktivität von L-Typ-Calcium-Kanälen (Surmeier und Sulzer 2013; Braak et al. 2003).

Die eigentliche Ursache, welche zum Auftreten der beschriebenen Pathologie führt, ist bisher nicht eindeutig identifiziert. Es wird ein Zusammenspiel aus einer Vielzahl von Faktoren angenommen. An dieser Stelle seien die wichtigsten Theorien erwähnt. Zur weiteren Vertiefung verweise ich auf die entsprechenden Publikationen. Dabei münden die postulierten Ursachen in zwei wesentlichen Pathomechanismen: einer mitochondrialen Dysfunktion und einem gestörten Proteinabbau, insbesondere für α -Synuclein. Bei Parkinson-Patienten konnte in Studien mehrfach ein defekter Komplex I der mitochondrialen Atmungskette festgestellt werden. Eine mögliche Ursache der Störung könnte eine direkte Beeinflussung durch α -Synuclein Aggregate sein (Poewe et al. 2017; Blandini et al. 2000). Weiterhin wurde eine Verbindung zur Schrittmacheraktivität der Neurone gezogen, denn der Rücktransport des einströmenden Calciums ist energieaufwendig. Zudem ist der Energieverbrauch in Axonen ohne Myelinisierung sehr hoch. Zusammengefasst wird eine Ausschöpfung der respiratorischen Reserve der Mitochondrien postuliert, was zu vermehrtem oxidativen Stress führt (Poewe et al. 2017; Surmeier und Sulzer 2013). Weiterhin spricht für eine Rolle der Mitochondrien in der Pathogenese des Morbus Parkinson die Entdeckung, dass mehrere ursächliche Gene des familiären Parkinsonsyndroms für Genprodukte codieren, die eine Rolle im mitochondrialen Stoffwechsel erfüllen, z.B DJ1, PINK1 und auch das PARKIN Gen (Schulz et al. 2011; Surmeier et al. 2011). Die Rolle des Proteinabbaus übernehmen das Ubiquitin-Proteasom-System und Lysosomen. Dabei wurde in einer Studie gezeigt, dass Hemmung dieser Systeme in dopaminergen Neuronen zu einer Aggregation von α -Synuclein führt (Xilouri et al. 2009).

Weitere Hinweise für eine Beteiligung der beiden Systeme zeigten sich im Rahmen der Untersuchung von Genmutationen des familiären Parkinson. So spielen die Produkte des SNCA- und PARKIN-Gen eine Rolle im Proteasomen-System, das GBA-Gen codiert für eine Glucocerebrosidase, die wichtig für die Funktion der Lysosomen ist (Schulz et al. 2011).

In Hinblick auf die Thematik dieser Arbeit sei an dieser Stelle auch die Glutamat-induzierte Neurotoxizität (Exzitotoxizität) erwähnt. Es wurde mehrfach gezeigt, dass eine im Rahmen des Morbus Parkinson entstehende Überaktivität des Glutamat-Systems in den Basalganglien, zu weiterer Schädigung von Neuronen führt (Blandini et al. 2000).

1.1.4 Diagnostik

Obwohl mittlerweile mehrere Instrumente zur Diagnosefindung zur Verfügung stehen, wird der Morbus Parkinson anhand seiner klinischen Symptome diagnostiziert. Grundvoraussetzung für die Diagnose ist das Auftreten von Bradykinese in Verbindung mit mindestens einem weiteren Kardinalsymptom (Tremor oder Rigor). Weiterhin werden unterstützenden Kriterien wie Hyposmie, Ansprechen auf L-DOPA, sympathische kardiale Denervierung und L-DOPA-induzierte Dyskinesien berücksichtigt. Es dürfen keine der Ausschlusskriterien für ein idiopathisches Parkinsonsyndrom vorliegen (Postuma et al. 2015). Unterstützend zur klinischen Diagnose können bildgebende Verfahren wie MRT, CT und transkranielle Sonographie angewendet werden. Weiterhin stehen nuklearmedizinische Verfahren wie FDG-PET oder DATScan zur Verfügung (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) 2016).

Neuste Studien liefern vielversprechende Ergebnisse zur Frühdiagnostik des Morbus Parkinson durch Biopsie von betroffenen Geweben mit Lewy-Körperchen Pathologie in der Peripherie. So konnten phosphorylierte α -Synuclein-Aggregate in Zellen des enterischen Nervensystems, der Glandula submandibularis sowie in dermalen Nervenfasern nachgewiesen werden (Doppler et al. 2017; Cersosimo 2015).

1.1.5 Therapie

Die Therapie des Morbus Parkinson ist rein symptomatisch. Dabei kommen im Wesentlichen folgenden Medikamente zum Einsatz: L-DOPA, Dopamin-Agonisten, Monoaminoxidase-B(MAO-B)-Hemmer, Catechol-O-Methyltransferase(COMT)-Hemmer, Amantadin und vereinzelt auch Anticholinergika. Die meisten Medikamente setzen am Problem des Dopamin-Mangels an und führen durch Dopamin-Ersatz oder Hemmung des Dopamin-Abbaus zu einer Verbesserung der motorischen Symptome.

Mit Fortschreiten der Erkrankung werden, aufgrund von Komplikationen oder Therapieresistenz, häufig auch invasive Verfahren wie die Tiefe Hirnstimulation eingesetzt. Da es zum Thema der Parkinson-Therapie umfangreiche Studien gibt, möchte ich im Folgenden die wichtigsten Eckpunkte zusammenfassen und verweise zur weiteren Vertiefung auf die entsprechende Literatur (Oertel 2017; Horstink et al. 2006).

Levodopa (L-DOPA) gilt bis heute als wirksamstes Medikament gegen die motorischen Symptome des Morbus Parkinson und wird als Goldstandard in Kombination mit den Decarboxylase-Hemmern Carbidopa und Benzerazid großzügig eingesetzt. Im Verlauf der Erkrankung kommt es jedoch, aufgrund von Verlust an Speicherkapazität und gestörter Aufnahme des Medikamentes im gastrointestinalen System, zu einer Reduktion der Wirkdauer und pulsatiler Freisetzung, was in der Entstehung von Dyskinesien mündet (LeWitt und Fahn 2016; Virmani et al. 2016).

Dopamin-Agonisten erreichen im Gegensatz zu L-DOPA einen länger anhaltenden Wirkspiegel und weisen somit ein geringeres Risiko für motorische Komplikationen auf. Heutzutage kommen lediglich non-Ergotamin-Derivate wie Pramipexol, Ropinirol, Piripedit und Rotigotin zum Einsatz. Des Weiteren steht Apomorphin als subkutane Injektionslösung zur Verfügung. Dopamin-Agonisten haben im Vergleich zu L-DOPA ein breites Spektrum an Nebenwirkungen. Hier seien vor allem Schlafattacken und Knöchelödeme genannt. Des Weiteren kann es zu Impulskontrollstörungen, Übelkeit, Erbrechen und orthostatischer Hypotension kommen (Smith et al. 2012).

Zu den Medikamenten, die den Abbau des Dopamins hemmen, zählen die MAO-B-Hemmer Rasagilin, Selegilin und Safinamid (neu seit 2015) sowie die COMT-Hemmer Tolcapon, Entacapon und Opicapon (neu seit 2016). MAO-B-Hemmer reduzieren den zentralen Abbau von Dopamin und L-DOPA. Im Gegensatz zu MAO-B-Hemmern dürfen COMT-Hemmer nur in Kombination mit L-DOPA eingesetzt werden und stabilisieren in dieser Anwendung dessen Wirkspiegel durch Hemmung der O-Methylierung des L-DOPAs in der Peripherie. Dabei ist der Einsatz von Tolcapon aufgrund eines möglichen Zusammenhangs mit Leberschädigung nur noch zweite Wahl (Bonifacio et al. 2007; Nutt et al. 1987).

Ein weiteres wichtiges Medikament ist der NMDA-Antagonist Amantadin, der in der Behandlung von L-DOPA-induzierten Dyskinesien eingesetzt wird. Weiteren NMDA-Rezeptor-Antagonisten konnte keine positive Wirkung auf diese Dyskinesien nachgewiesen werden (Smith et al. 2012). Im Rahmen des vermuteten Einflusses von Exzitotoxizität bei der Pathogenese des Morbus Parkinson sind Glutamatrezeptoren jedoch weiterhin ein attraktiver Angriffspunkt bei der Entwicklung neuer Medikamente (vgl. Kapitel 1.3).

Der Einsatz von Anticholinergika, in Form der unselektiven Muskarinrezeptor-Antagonisten Biperiden, Bornaprin und Trihexiphenidyl, stellt eine der ältesten Therapiemöglichkeit des Morbus Parkinson dar. Dabei konnte eine Verbesserung der motorischen Symptome, vor allem des Tremors, gezeigt werden. Anticholinergika werden jedoch aufgrund ihrer umfassenden Nebenwirkungen wie Blasenentleerungsstörungen, Mundtrockenheit, Übelkeit, Glaukom und der Förderung von kognitiver Dysfunktion, aktuell nur noch selten eingesetzt (Smith et al. 2012; Horstink et al. 2006). In den letzten Jahren rückt das cholinerge System wieder in das Interesse der Parkinson-Forschung. Es wurde mehrfach gezeigt, dass eine Blockade cholinergischer Interneurone die motorischen Symptome des Morbus Parkinson verbessert (Ztaou et al. 2016). Mit der Entdeckung einer selektiven Blockade von muskarinergen Rezeptoren stehen neue mögliche Angriffspunkte zur Verfügung. Durch den selektiven Ansatz sollen die umfangreichen Nebenwirkungen reduziert werden (Ztaou et al. 2016). Ein weiterer selektiver Ansatzpunkt ist die Hemmung der Aktivität cholinergischer Interneurone durch lokal injiziertes Botulinumneurotoxin-A (BoNT/A). Der erfolgreiche Einsatz von BoNT/A wurde im Tiermodell erstmals von Wree et al. beschrieben (Wree et al. 2011).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Parkinson-Therapie ist die Tiefe Hirnstimulation. Dabei wird über stereotaktisch platzierte Elektroden die Aktivität des Nucleus subthalamicus (STN) oder Globus pallidus internus (GPi) beeinflusst (Deuschl et al. 2006). Sie kommt vor allem bei Patienten mit erheblichen motorischen Nebenwirkungen und schwerem Tremor zum Einsatz (Smith et al. 2012).

In den letzten Jahren gab es intensive Studien zum Einsatz von Gentherapie bei Morbus Parkinson. Weitere Untersuchungen beschäftigen sich seit mehreren Jahren mit der direkten Zelltransplantation von Stammzellen in Teile des Gehirns, sowie der Möglichkeit einer aktiven oder passiven Immunisierung gegen die Aggregation von α -Synuclein (Poewe et al. 2017). Während im Rahmen der Transplantationsstudien keine klinischen Erfolge verzeichnet wurden, werden die ersten gentherapeutischen Verfahren in Phase I Studien erfolgreich getestet (Christine et al. 2009).

1.2 Basalganglien

1.2.1 Einleitung

Als Basalganglien bezeichnet man eine Gruppe von fünf subkortikalen Kernen mit Sitz im basalen Telenzephalon, die eine wichtige Rolle in der Regulation von Bewegungsabläufen und weiteren kortikalen Funktionen spielen. (Blandini 2000; Obeso 2008).

Zu den Basalganglien zählen der Nucleus caudatus, das Putamen, der Globus pallidus (GP), der STN und die SN. Dabei werden der Nucleus caudatus und das Putamen hinsichtlich ihrer gemeinsamen Funktion als Einheit zusammengefasst und als Corpus striatum bezeichnet (Blandini, 2000). In der Ratte stellen sie eine homogene Struktur dar. Bei Menschen und Primaten hingegen, werden der Nucleus caudatus und das Putamen im Verlauf der Entwicklung, bis auf vereinzelt verbindende Brücken grauer Substanz, durch absteigende kortikale Projektionsfasern getrennt (Blandini et al. 2000; Wree und Schmitt 2015).

1.2.2 Striatum

Das Striatum als größter Kern erhält die meisten Afferenzen und stellt somit den „Haupteingangskern“ der Basalganglien dar. Den größten Anteil haben glutamaterge Afferenzen aus weiten Bereichen des Kortex und des Thalamus. Weitere glutamaterge Einflüsse bekommt das Striatum aus der Amygdala. Unter den Basalganglien weist das Striatum die höchste Konzentration an Glutamaterezeptoren auf (vgl. Kapitel 1.3). Weiterhin erhält der Kern dopaminerge Afferenzen aus der SNpc, welche die Übertragung an glutamatergen Synapsen modulieren (Blandini et al. 2000). Neben den genannten Hauptafferenzen erreichen das Striatum serotonerge und noradrenerge Projektionen aus den Nuclei raphes und dem Nucleus coeruleus des Hirnstammes. Das Striatum besteht zu 95 % aus GABAergen Projektionsneuronen. Hierbei unterscheidet man je nach Projektionsziel zwei verschiedene Untergruppen: GABAerge Projektionsneurone, die Enkephalin als Co-Transmitter enthalten und D1-Rezeptoren exprimieren, projizieren in GPI und Substantia nigra pars reticulata (SNpr). GABAerge Neuronen mit den Co-Transmittern Substanz P und Dynorphin, die D2-Rezeptoren exprimieren, projizieren in den Globus pallidus externus (GPe) (Blandini et al. 2000; Wree und Schmitt 2015). Bei den restlichen 5 % der Neuronen des Striatums handelt es sich um Interneurone. Man unterscheidet vier verschiedenen Klassen, wobei drei davon den Transmitter GABA produzieren, die vierte Population nutzt Acetylcholin (ACh). Die GABAergen Interneurone werden je nach ihrer Zusammensetzung weiter unterschieden in Paralbumin-positive, NO-Synthase/Somatostatin-positive und Calretinin-positive Interneurone (Calabresi et al. 2014; Wree und Schmitt 2015). Sie üben einen inhibitorischen Einfluss auf die Projektionsneurone des Striatums aus. Die cholinergen Interneurone sind tonisch aktiv und spielen, trotz ihres geringen Anteils an der Gesamtneuronenzahl des Striatums, eine wichtige Rolle in der Regulation von Bewegungen und für synaptische Plastizität (Pisani et al. 2007). Dabei ist die Funktion der cholinergen Interneurone nicht eindeutig geklärt. Es wurde eine inhibitorische aber auch exzitatorische Wirkung auf die Erregbarkeit der striatalen Projektionsneurone beschrieben (Obeso et al. 2008; Surmeier et al. 2007).

Einigkeit herrscht darüber, dass Dopamin und ACh sich im Striatum gegensätzlich beeinflussen. So reguliert Dopamin die ACh-Ausschüttung über einen D2-Rezeptor-vermittelten Mechanismus. Die Signalwege des D1-Rezeptors an striatalen Projektionsneuronen werden durch cholinerge Aktivierung des Muskarinrezeptors M4 negativ beeinflusst (Ztaou et al. 2016; Surmeier et al. 2007).

1.2.3 Globus pallidus

Im GP unterscheidet man zwei Anteile mit unterschiedlicher Funktion. Sie werden nach ihrer Lage im Primatenhirn als GPi und GPe bezeichnet. In der Ratte entspricht der GPi dem Nucleus entependuncularis. Die Bezeichnung GP meint hier den GPe (Blandini et al. 2000).

Der GPi ist der kleinste Kern der Basalganglien und besteht hauptsächlich aus GABAergen Projektionsneuronen, die Efferenzen in den Thalamus senden. Afferenzen erreichen ihn vor allem aus dem Striatum (GABA) und dem STN (Glutamat). Der GPi projiziert hauptsächlich in motorische Kerne des Thalamus, wie dem ventrolateralen Kern, aber auch in Kerne mit Verbindung zum Assoziationkortex und dem Limbischen System.

Der GPe ist Teil des indirekten Weges der Basalganglienschleife (siehe 1.2.6) und besteht hauptsächlich aus GABAergen Projektionsneuronen. Hauptafferenzen erreichen ihn aus dem Striatum, dem STN und der SNpc. Der GPe projiziert inhibitorisch in den STN sowie in GPi und SNpr.

1.2.4 Substantia nigra

Die SN sitzt im Tegmentum des Mesenzephalon und besteht aus zwei unterschiedlichen Bereichen.

Die SNpc besteht aus Neuromelanin-haltigen Neuronen, die den Transmitter Dopamin produzieren. Ihr Hauptprojektionsziel sind die D1- und D2-Rezeptor-tragenden Neurone des Striatums. Auf dem Weg dorthin zweigen Axonkollateralen zum GPe und STN ab. Die Neurone der SNpc erhalten Afferenzen von GABAergen Projektionsneuronen des Striatums und GPe, sowie glutamaterge Projektion aus dem STN.

Die SNpr besteht aus GABAergen Neuronen und besitzt die gleichen Eigenschaften wie der GPi. Sie projiziert ebenfalls in den Thalamus, allerdings vorwiegend in den ventroanterioren und mediodorsalen Kern (Blandini et al. 2000; Wree und Schmitt 2015). Die SNpr und der GPi senden die Hauptefferenzen der Basalganglien und stellen so den Austrittspunkt von Informationen dar. Die GABAergen Neurone der beiden Kerne sind tonisch aktiv und werden vor allem durch striatale Projektionen phasisch gehemmt (Sgambato-Faure und Cenci 2012).

Wie oben beschrieben erreichen die Neurone der beiden Kerne unterschiedliche Bereiche des Thalamus, was unterschiedliche Funktionen widerspiegelt.

1.2.5 Nucleus subthalamicus

Der STN ist der einzige glutamaterge Kern der Basalganglien. Seine Hauptefferenz projiziert tonisch in die beiden Ausgangskerne (Gpi und Snr). Außerdem hat er exzitatorischen Einfluss auf den GPe und die SNpc. GPe und SNpc ihrerseits senden Afferenzen zum STN, sodass ein Feedback-System entsteht. Weiterhin wird der STN durch Projektionen aus dem Kortex, dem Thalamus und auch dem Nucleus pendunculopontinus beeinflusst (Obeso et al. 2008; Blandini et al. 2000; Wree und Schmitt 2015).

1.2.6 Basalganglienschleife

Gemeinsam bilden die oben genannten Kerne eine Einheit zur Verarbeitung kortikaler Signale. Dabei werden die Informationen nach Eingang in das Striatum an die anderen Kerne weitergeleitet, moduliert und am Ende über den Thalamus zurück an den Kortex gesendet, sodass ein geschlossener Informationskreis, die Basalganglienschleife, entsteht (Blandini et al. 2000). Dieser Kreislauf wird von unterschiedlichen kortikalen Bereichen genutzt. So lassen sich unterschiedliche Funktionskreise unterscheiden. Projektionen aus dem sensomotorischen Kortex bilden eine motorische Schleife zur Verarbeitung von zielgerichteten Bewegungen. Weitere Kreisläufe verbinden die Basalganglien mit dem Limbischen System oder Assoziationskortex und spielen eine wichtige Rolle für kortikale Funktionen wie Emotionen, Aufmerksamkeit, Lernen und Gedächtnis (Obeso et al. 2008). In dieser Arbeit soll der Schwerpunkt auf der motorischen Basalganglienschleife liegen (siehe Abbildung 1).

Die klassische Theorie über die Verschaltung der Basalganglien in der motorischen Schleife beschreibt zwei unterschiedliche Wege, über welche die Projektionsneurone des Striatums ihre Informationen an die Ausgangsneurone GPi und SNpr weiterleiten (DeLong 1990; Albin et al. 1989). Beim direkten Weg werden exzitatorische, glutamaterge Signale auf D1-Rezeptor-tragende striatale Projektionsneurone übertragen. Diese Neurone senden ihre Axone direkt zu GPi und SNpr und bilden dort inhibitorische Synapsen. Die tonisch inhibitorische Aktivität der Ausgangsneurone wird somit gehemmt, was zu einer gesteigerten thalamokortikalen Projektion führt. Das Resultat ist eine gesteigerte motorische Aktivität. Als Gegenspieler dieses Weges wird der indirekte Weg bezeichnet, der in einer reduzierten motorischen Aktivität endet. Glutamaterge Signale werden im Striatum auf D2-Rezeptor-tragende Projektionsneurone übertragen. Diese haben einen inhibitorischen Einfluss auf den GPe.

Reduzierte Aktivität des GPe führt zu einer Enthemmung des STN. Somit folgt eine gesteigerte Erregung des GPi und SNpr durch Neurone des STN, was mit einer gesteigerten Hemmung der Thalamuskern einhergeht (Calabresi et al. 2014). Nigrostriatale Projektionen aus der SNpc modulieren die Aktivität der beiden Wege. Dopamin steigert über D1-Rezeptoren die Erregbarkeit der striatalen Neurone des direkten Weges und hemmt im Gegenzug durch Aktivierung von D2-Rezeptoren die Aktivität des indirekten Weges (Gardoni und Di Luca 2015; Surmeier et al. 2007). Ergänzend wurde ein direkter Projektionsweg vom Kortex zum STN beschrieben (DeLong 1990).

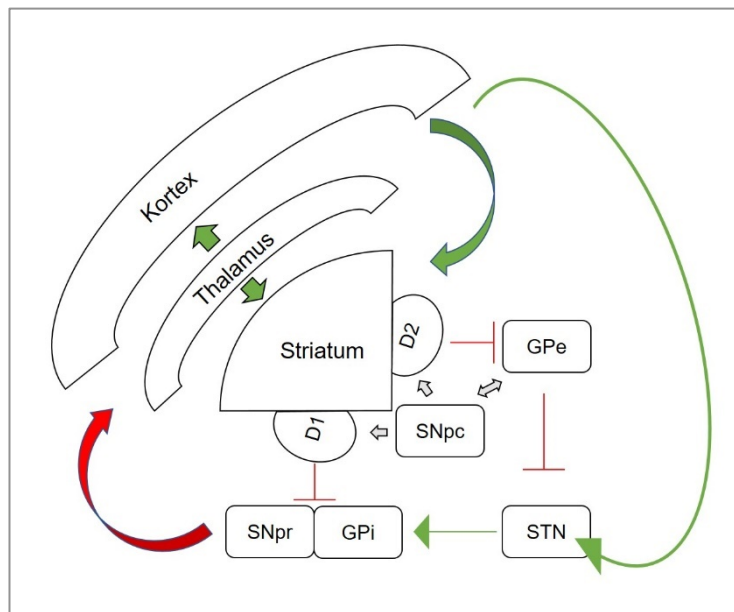


Abbildung 1: Verschaltung der Basalganglien

Man unterscheidet exzitatorische Projektionen mit Glutamat (grün), inhibitorische Projektionen mit GABA (rot) und dopaminerge Projektionen (grau). Die Projektionsneurone des Striatums exprimieren D1- oder D2-Rezeptoren und projizieren in die Ausgangskerne der Basalganglien (SNpr/GPi) und den GPe. Für eine ausführliche Beschreibung der Signalwege, siehe Kapitel 1.2.6

An dieser Stelle soll auf Einschränkungen des klassischen Modells hingewiesen werden. Mehrere Studien konnten eine gemeinsame Expression von D1- und D2-Rezeptoren auf striatalen Projektionsneuronen nachweisen. Des Weiteren wurde die Existenz eines heteromeren D1-/D2-Rezeptors postuliert. In-vivo Aktivitätsmessungen der beiden Signalwege zeigten, dass Bewegungsinitiierung und Ausführung mit einer gesteigerten Aktivität von Neuronen beider Wege einhergeht. Des Weiteren wurde in mehreren Studien nachgewiesen, dass ein Großteil der in die Ausgangskerne projizierenden Neurone, Axonkollaterale zum GPe bildet und somit eine Verbindung zwischen den beiden Systemen schafft. Weitere Verbindungen entstehen durch Projektionen der Interneurone des Striatums sowie direkte Axonkollaterale der striatalen Projektionsneurone untereinander (Calabresi et al. 2014; Huot et al. 2013).

Zusammenfassend zeigen die Studien der letzten Jahre eine Wendung von einer strikten Trennung zweier unterschiedlicher Systeme hin zu einem Zusammenspiel der verschiedenen Projektionsneurone. Somit ist das klassische Modell der Basalganglienschleife heutzutage als vereinfachte Darstellung einer komplexen Verschaltung der Basalganglien zu verstehen. Durch seine übersichtliche Struktur hat es in der Vergangenheit großen Anteil an der Aufklärung der Pathogenese des Morbus Parkinson und der Untersuchung von Therapiemöglichkeiten geleistet (Huot et al. 2013). Aus diesem Grunde wird es auch in dieser Arbeit exemplarisch zur Darstellung der Ergebnisse und als Grundlage für Hypothesenbildung genutzt.

1.2.7 Rolle der Basalganglien in der Pathogenese des Morbus Parkinson

Ausgangspunkt in der Pathogenese des Morbus Parkinson ist die Degeneration von dopaminergen Neuronen in der SNpc (vgl. Kapitel 1.1.3). Dies führt zu einem reduzierten dopaminergen Einfluss auf die Neurone des Striatums. Auf Grundlage des klassischen Modells wurde gezeigt, dass eine reduzierte dopaminerge Innervierung der striatalen Projektionsneurone zu einer gesteigerten Aktivität des indirekten Weges und reduzierter Aktivität des direkten Weges führt. Die Folge ist eine Überaktivität der Ausgangsneurone von GPi und SNpr, die in einer gesteigerten Hemmung der thalamokortikalen Projektion mündet (Obeso et al. 2008). Korrelat einer gesteigerten Aktivität des indirekten Weges ist eine Überaktivität des STN, der aufgrund reduzierter Aktivität des GPe weniger gehemmt wird und dessen Neurone so zu einer verstärkten Glutamat-Ausschüttung in GPi und SNpr führen. Abgesehen von diesen beiden Kernen konnte auch in weiteren Kernen der Basalganglienschleife, vor allem dem Striatum, eine gesteigerte Konzentration von Glutamat als Folge der dopaminergen Denervierung nachgewiesen werden (Chotibut et al. 2014). Neben diesen Veränderungen bleibt der zentrale Punkt in der Pathogenese des Morbus Parkinson bis heute der STN, dessen Überaktivität im Rahmen der Krankheit mehrfach beschrieben wurde. Neueste Studien am Tiermodell konnten jedoch keine reduzierte Aktivität des GPe, als durch das klassische Modell erklärte Ursache der Enthemmung des STN, feststellen (Levy et al. 1997). Eine entscheidende Rolle scheint hingegen die Verbindung des STN zur SNpc zu spielen. Dopaminerge Neurone der SNpc wirken über D2-Rezeptoraktivierung inhibitorisch auf den STN ein. Gleichzeitig projiziert der STN zur SNpc und löst dort eine gesteigerte Glutamat-Freisetzung aus. Der Untergang von Neuronen der SNpc führt so zu einer Enthemmung des STN, was eine gesteigerte Rückprojektion zur SNpc zur Folge hat. Aufgrund dieser Verbindung wird ein exzitotoxischer Einfluss des STN auf die SNpc angenommen, der die Degeneration der Neurone weiter fördert. Weiterhin wird die Überaktivität des STN durch eine gesteigerte Projektion aus dem Nucleus penducolopontinus unterstützt (Obeso et al. 2008).

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson spielen außerdem cholinerge Interneurone. In Folge der Degeneration von dopaminergen Neuronen, kommt es zu einer Überaktivität der cholinergen Interneurone im Striatum. Ursächlich dafür ist eine reduzierte Aktivierung von D2-Rezeptoren (Obeso et al. 2008). Dabei kommt es durch Wegfall des D2-vermittelten Mechanismus zu einer reduzierten Aktivität von muskarinergen Rezeptoren auf cholinergen Interneuronen. Diese fungieren als Autorezeptoren und sind Teil eines negativen Feedback-Mechanismus zur Kontrolle der ACh-Ausschüttung. Die Abnahme der Autorezeptor-Aktivität führt so zu einer gesteigerten Freisetzung von ACh (Ztaou et al. 2016; Pisani et al. 2007).

1.3 Glutamatrezeptoren

1.3.1 Einleitung

L-Glutamat ist eine Aminosäure und der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS). Glutamat vermittelt seine Wirkung über zwei verschiedene Rezeptorklassen: ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren (mGlu-Rezeptoren) (Ozawa et al. 1998).

Alle ionotropen Glutamatrezeptoren teilen denselben Aufbau und stellen homo- oder heteromere Komplexe aus vier Untereinheiten dar, die gemeinsam einen Ionenkanal bilden. Jede Untereinheit besteht aus 3 transmembranösen Domänen und einer kanalbildenden Domäne (Lerma 2003), siehe Abbildung 2. Die Subtypen der Glutamatrezeptoren werden nach ihrem stärksten Agonisten benannt (Bozkurt 2004). Heutzutage werden ionotrope Glutamatrezeptoren in drei Gruppen unterteilt: AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren. Dabei vermitteln ionotrope Rezeptoren den Großteil der exzitatorischen Übertragung an Synapsen (Ozawa et al. 1998).

Die mGlu-Rezeptoren hingegen sind vor allem an der Modulation von synaptischer Übertragung im Rahmen synaptischer Plastizität beteiligt (Petrálie et al. 1996). Sie sind G-Protein-gekoppelt und stellen ein durch Disulfidbrücken stabilisiertes Dimer dar (siehe Abbildung 2). Jede Untereinheit besteht aus 7 transmembranösen Domänen (Almaric et al. 2013).

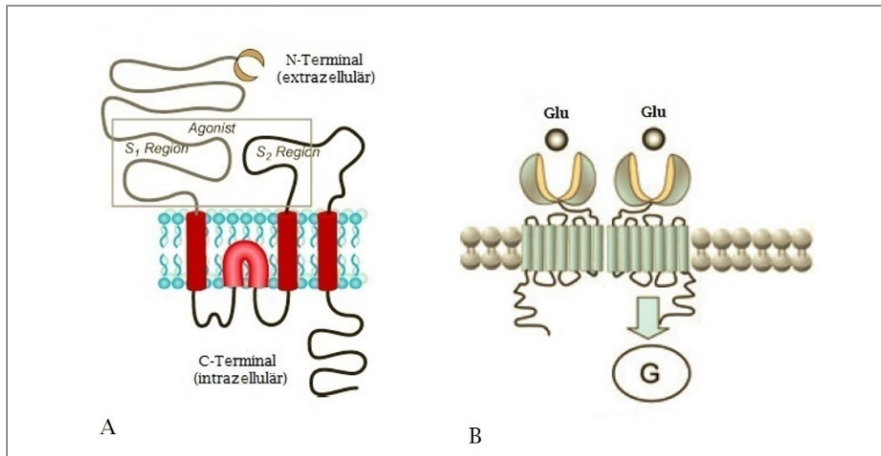


Abbildung 2: Aufbau der Glutamaterezeptoren

A Schematische Darstellung einer Untereinheit des ionotropen Glutamaterezeptors. Sie besteht aus drei transmembranösen Domänen und einer porenbildenden Domäne. Der Agonist bindet an die S1/S2-Region. Modifiziert aus: Handbook of Basal Ganglia Structure and Function, (Emson et al. 2010).

B Schematische Darstellung eines metabotropen Glutamaterezeptors. Dabei sind zwei transmembranöse Untereinheiten über Disulfidbrücken miteinander verknüpft und interagieren mit einem G-Protein (G). Aus: The Journal of Physiology, (Pin et al. 2009).

Die mGlu-Rezeptoren werden in drei großen Gruppen zusammengefasst: Gruppe I (GluR1,5), Gruppe II (GluR2,3) und Gruppe III (GluR4,6,7,8). Zur Gruppe I gehören Gq-gekoppelte Rezeptoren, die ihre Wirkung über Aktivierung der Phospholipase C (PLC) vermitteln. Gruppe II und III Rezeptoren sind Gi-gekoppelt und bewirken eine Hemmung der Adenylatcyclase (AC) (Testa et al. 1994), vgl. Abbildung 3.

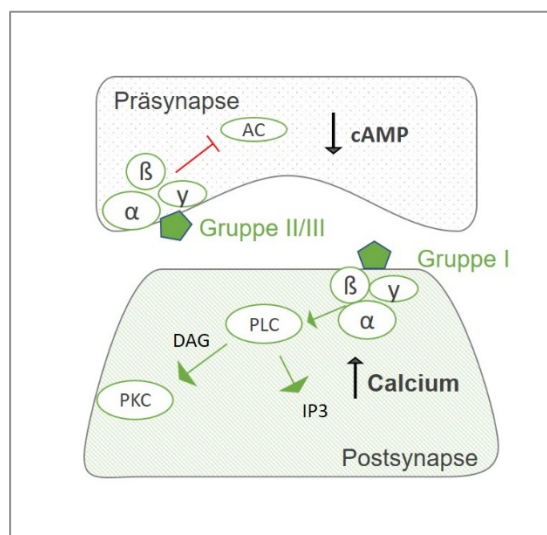


Abbildung 3: Sitz und Signalweg der metabotropen Glutamaterezeptoren

Aktivierung der PLC durch die Untereinheiten des G-Proteins der Gruppe-I-Rezeptoren, führt zur Bildung der beiden intrazellulären Botenstoffe Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). IP3 steigert die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Hemmung der AC durch die freie α -Untereinheit des G-Proteins der Gruppe-II/III-Rezeptoren, führt zu erniedrigten cAMP-Spiegeln und folglich zu einer verminderten Aktivität von Proteinkinasen.

Rezeptoren der Gruppe I sitzen klassischerweise in der postsynaptischen Membran und sind an der Übertragung exzitatorischer Signale beteiligt. Gruppe II und III Rezeptoren sind überwiegend an der präsynaptischen Membran lokalisiert und hemmen die Transmitterausschüttung (Nicoletti et al. 2011; Emson et al. 2010), siehe Abbildung 3.

mGlu-Rezeptoren stellen einen alternativen Angriffspunkt für Medikamente zur Therapie von pathologisch erhöhten Glutamatkonzentrationen dar (Ossowska et al. 2002). Obwohl sich diese Arbeit ausschließlich mit der Gruppe II der mGlu-Rezeptoren befasst, möchte ich im Folgenden auch einen kurzen Überblick über die Rolle der restlichen mGlu-Rezeptoren geben. So sitzen mGlu4-Rezeptoren der Gruppe III auf striatalen Projektionsneuronen des indirekten Weges und können die synaptische Übertragung an der GABAergen Synapse reduzieren. mGlu4-Rezeptoren können so die Aufgabe von Dopamin übernehmen und einer Überaktivität des STN entgegenwirken (Conn et al. 2005). Dabei konnte im Tiermodell des Morbus Parkinson gezeigt werden, dass mGlu4-Rezeptoragonisten motorische Symptome und L-DOPA-induzierte Dyskinesien lindern (Almaric et al. 2013). mGlu5-Rezeptoren sitzen im Striatum auf der postsynaptischen Membran glutamaterger Synapsen (Ossowska et al. 2002). mGluR5-Antagonisten zeigen im Tiermodell positive Wirkung auf motorische Symptome des Morbus Parkinson sowie auf L-Dopa-induzierte Dyskinesien (Nicoletti et al. 2011).

1.3.2 AMPA-Rezeptoren

Die meisten exzitatorischen Potentiale im ZNS werden über AMPA-Rezeptoren vermittelt. AMPA-Rezeptoren sind an der postsynaptischen Membran lokalisiert, vereinzelt wurde ein präsynaptischer Sitz beschrieben. Charakteristisch ist eine kurze Latenzzeit der Rezeptoren. Ihre Hauptaufgabe besteht in der schnellen Übertragung von Potentialen an exzitatorischen Synapsen. (Wisden et al. 2000; Errami und Nieoullon 1988).

Der AMPA-Rezeptor stellt ein Tetramer aus vier Untereinheiten dar (GluR1 bis GluR4). Die einzelnen Untereinheiten verleihen dem Rezeptor seine Eigenschaften. Dabei verhindert die GluR2-Untereinheit einen Einstrom von Calcium. Die Mehrheit der zentralen AMPA-Rezeptoren enthält GluR2 und ist somit überwiegend undurchlässig für Calcium (Kobylecki et al. 2013). Eine weitere wichtige Rolle kommt der GluR1-Untereinheit zu. Posttranslationale Phosphorylierung am C-terminalen Serin, reguliert die Dichte und Eigenschaften des AMPA-Rezeptors. Eine Steuerung dieses Prozesses durch Dopamin und ACh wurde beschrieben (Xue et al. 2017; Ba et al. 2006).

Im Striatum werden die Untereinheiten GluR1, GluR2 und GluR3 exprimiert. Dabei wurde eine kleine Population calciumpermeabler AMPA-Rezeptoren beschrieben.

Die striatalen AMPA-Rezeptoren sitzen vor allem auf GABAergen Projektionsneuronen und cholinergen Interneuronen (Kobylecki et al. 2013; Emson et al. 2010; Wisden et al. 2000), vgl. Abbildung 4. Zusätzlich wurde ein präsynaptischer Sitz auf dopaminergen Projektionsneuronen der SN postuliert (Tarazi et al. 2000; Zavitsanou et al. 1996; Wüllner et al. 1994). Errami und Nieoullon dagegen konnten solch einen präsynaptischen Sitz nicht nachweisen. Des Weiteren wird ein präsynaptischer Sitz von AMPA-Rezeptoren an kortikostriatalen Synapsen kontrovers diskutiert. Errami und Nieoullon gingen in einer Studie von einer Autoregulation der kortikostriatalen Afferenzen über AMPA-Rezeptoren aus, in einer weiteren Studie konnten sie die Annahme jedoch nicht bestätigen (Errami und Nieoullon 1988). Tarazi et al. konnten in Deaffferenzierungsstudien ebenfalls keinen Sitz auf kortikostriatalen Enden nachweisen (Tarazi et al. 1998b).

Eine mögliche Rolle von AMPA-Rezeptoren bei L-DOPA-induzierten Dyskinesien und eine damit verbundene positive Wirkung von AMPA-Rezeptor-Antagonisten im Rahmen der Parkinson-Therapie wurde mehrfach postuliert. Dabei wurde eine gesteigerte AMPA-Rezeptor-Aktivität und Rezeptor-Phosphorylierung unter L-DOPA-Therapie beschrieben. Des Weiteren wird die Zunahme von calciumpermeablen AMPA-Rezeptoren im Krankheitsverlauf diskutiert (Sgambato-Faure und Cenci 2012; Ba et al. 2006). Der erfolgreiche Einsatz von AMPA-Rezeptor-Antagonisten im Tiermodell konnte in klinischen Studien jedoch nicht bestätigt werden (Gardoni und Di Luca 2015).

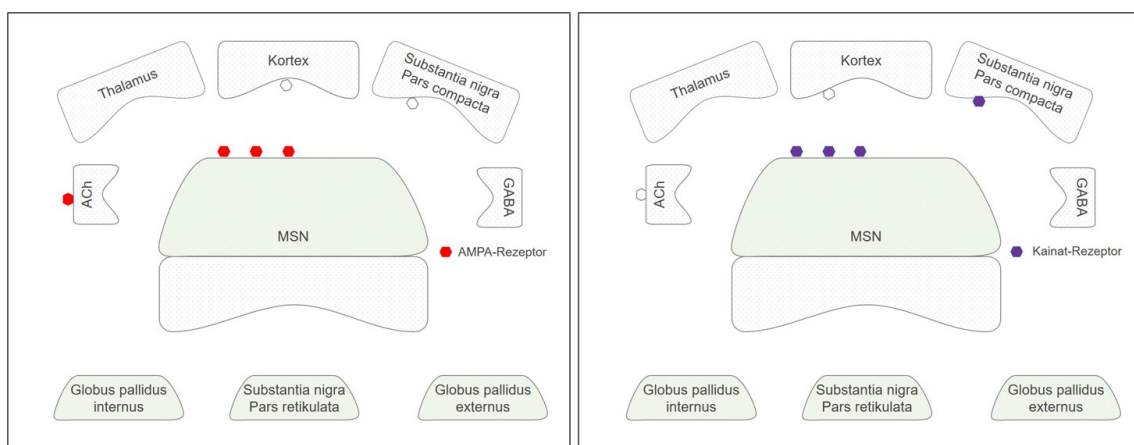


Abbildung 4: Verteilung der AMPA- und Kainat-Rezeptoren im Striatum

Zusammenfassung, der aus der Literatur bekannten Angaben zum Sitz auf präsynaptischen (gebogen) und postsynaptischen (gerade) Membranen. Dabei sind mehrfach publizierte Lokalisationen farbig und kontrovers diskutierte farblos dargestellt. MSN: Hauptprojektionsneuron des Striatums; ACh: cholinerges Interneuron; GABA: GABAerges Interneuron.

1.3.3 Kainat-Rezeptoren

Die Rolle der Kainat-Rezeptoren im ZNS ist im Vergleich zu anderen Glutamaterezeptoren noch relativ schlecht verstanden. Sie sitzen auf post- sowie auf präsynaptischen Membranen. Über ihren Sitz an der Präsynapse modulieren sie die Transmitterfreisetzung. An der Postsynapse induzieren Kainat-Rezeptoren ein kleinamplitudiges, exzitatorisches Potential. Im Vergleich zu AMPA-Rezeptoren inaktivieren sie verlangsamt. Sinn dieser langsamen Erregungsentstehung könnte die Verschiebung des Membranpotentials in Richtung des Schwellenpotentials zur erleichterten Generierung exzitatorischer Potentiale sein (Lerma und Marques 2013; Wisden et al. 2000). Kainat-Rezeptoren werden im Rahmen der Pathogenese von Schizophrenie, Depression und Epilepsie untersucht (Mollerud et al. 2017). Eine möglich unterstützende Rolle bei der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität wurde in den letzten Jahren ebenfalls beschrieben (Wang et al. 2005).

Für Kainat-Rezeptoren existieren fünf verschiedenen Untereinheiten, aus denen ein tetramerer Ionenkanal gebildet wird. Dabei können sich die niedrig-affinen Untereinheiten GluK1-GluK3 (früher GluR5-GluR7) sowohl zu homomeren als auch heteromeren Rezeptoren zusammenfinden. Die hoch-affinen Untereinheiten GluK4 und GluK5 (früher KA1 und KA2) funktionieren nur als heteromere Rezeptoren. Sie benötigen immer eine Untereinheit aus der Gruppe der GluK1-3 Untereinheiten (Mollerud et al. 2017; Lerma und Marques 2013).

Im Gegensatz zu den anderen ionotropen Rezeptoren, wurde für Kainat-Rezeptoren zusätzlich eine Verbindung zu G-Proteinen nachgewiesen. Des Weiteren bestehen Verbindungen zu intrazellulären Proteinen wie zum Beispiel PSD-95, PICK1, Calcineurin, SNAP-25, Neto1 und Neto2. Der genaue Mechanismus des G-Protein-vermittelten Signalweges bleibt bisher jedoch unklar (Lerma und Marques 2013; Selak et al. 2009). Ergänzend dazu wurde in einer weiteren Studie die Regulation des Kainat-Rezeptors durch Phosphorylierung und ein Einfluss von mGlu5-Rezeptoren beschrieben (Cho et al. 2003). Somit scheint der Kainat-Rezeptor in ein komplexes System aus Signalwegen eingebettet zu sein.

In den Basalganglien kommen vor allem die Untereinheiten GluK2, GluK3 und GluK5 vor (Emson et al. 2010; Bernard et al. 1996). Im Striatum sind Kainat-Rezeptoren an der Entstehung exzitatorischer postsynaptischer Potentiale (EPSP) beteiligt und sitzen hauptsächlich auf striatalen Projektionsneuronen (siehe Abbildung 4). Der Sitz auf präsynaptischen Neuronenenden im Striatum wird kontrovers diskutiert. Ein präsynaptischer Sitz auf hippocampostriatalen Projektionsneuronen wurde postuliert (Tarazi et al. 1998a).

Eine präsynaptische Lokalisation auf kortikostriatalen Afferenzen konnte in mehreren Studien nicht nachgewiesen werden (Greenamyre und Young 1989; Tarazi et al. 1998b). Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie ein Sitz auf kortikostriatalen Enden postuliert (Biziere und Coyle 1979). Ein Sitz auf nigrostriatalen Enden wurde mehrfach beschrieben (Tarazi et al. 1998b; Zavitsanou et al. 1996; Wüllner et al. 1994; Tallaksen-Greene et al. 1992). Zudem sitzen Kainat-Rezeptoren möglicherweise auf cholinergen Interneuronen (Jin et al. 2000).

In den letzten Jahren wurde zudem ein präsynaptischer Sitz von Kainat-Rezeptoren im GP nachgewiesen. Als Autorezeptoren auf subthalamopallidalen Projektionsneuronen modulieren sie die Glutamat-Ausschüttung im GP, als Heterorezeptoren auf striatopallidalen Projektionsneuronen die Ausschüttung des Transmitters GABA. Kainat-Rezeptoren stellen so einen weiteren möglichen Angriffspunkt für die Parkinson-Therapie dar. Sie haben einen positiven Einfluss auf die überaktive striatopallidale GABAerge und subthalamisch glutamaterge Übertragung, die sich im Rahmen der Krankheit entwickelt (Jin et al. 2006).

1.3.4 NMDA-Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren stellen die größte Gruppe ionotroper exzitatorischer Glutamaterezeptoren dar und nehmen eine spezifische Stellung ein. Sie besitzen neben der Durchlässigkeit für Kalium und Natrium eine sehr hohe Calcium-Permeabilität, und eine, im Vergleich zu AMPA-Rezeptoren, langsame Kinetik mit verlängerten Öffnungszeiten (Wong et al. 2009; Wisden et al. 2000; Araki et al. 2000; Olney 1995). NMDA-Rezeptoren sind an der Generierung von EPSP im ZNS beteiligt und durch ihre Affinität zum Agonisten N-Methyl-D-Aspartat charakterisiert (Emson et al. 2010). Neben ihrem Beitrag zur Entstehung von EPSP an glutamatergen Synapsen, sind sie am Prozess der Langzeitpotenzierung beteiligt.

Chronische NMDA-Rezeptor-Aktivierung fördert über erhöhte intrazelluläre Calcium-Spiegel Autophagie und Apoptose, sowie die Bildung freier Radikale. Die so entstehende Exzitotoxizität wurde mehrfach beschrieben (Emson et al. 2010; Blandini 2010). In mehreren Studien wurde eine Beteiligung der NMDA-Rezeptoren an neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Parkinson postuliert. Des Weiteren scheinen die Rezeptoren eine wichtige Rolle bei Zelluntergang nach Ischämie zu spielen (Wong et al. 2009; Olney 1995).

Der NMDA-Rezeptor besteht aus vier Untereinheiten, die gemeinsam einen Kationenkanal bilden (siehe Abbildung 5). NR1 ist als fundamentale Untereinheit immer enthalten. Weitere mögliche Untereinheiten sind NR2 sowie NR3 (NR3A und NR3B) (Emson et al. 2010; Wisden et al. 2000). Dabei codiert ein Gen mit 22 Exonen für die NR1-Untereinheit. Durch alternatives Spleißen entstehen 8 Isoformen (NR1A bis NR1H). Im Gegensatz dazu werden die Isoformen der NR2A-Untereinheit (NR2A - NR2D) durch 4 verschiedene Gene codiert (Mellone und Gardoni 2013; Loschmann et al. 2004). NR2A und B steuern die Öffnungsdauer des Rezeptors. Je mehr NR2B-Untereinheiten enthalten sind, desto länger ist die Öffnungsdauer. Die Pore des Kanals wird spannungsabhängig durch einen Magnesium-Block besetzt. Eine Öffnung ist nur bei vordepolarisierter Membran möglich. Neben der Transmitterbindungsstelle für Glutamat und NMDA, besitzt der Rezeptor Bindungsstellen für die Coagonisten Glycin und Serin (Wisden et al. 2000; Olney 1995). Eine weitere regulatorische Bindungsstelle stellt die PCP-Bindungsstelle im Kanalinneren dar. Dabei binden PCP, Ketamin, TCP und MK801 selektiv als Antagonisten. Voraussetzung für diese Bindung ist jedoch ein geöffneter Kanal (Monaghan et al. 1989). Des Weiteren können Zink und Polyamine den NMDA-Rezeptor über spezifische Bindungsstellen modulieren (Emson et al. 2010; Subramaniam und McGonigle 1991). Die GluN2-Untereinheit interagiert über PSD-95 mit dem Zytoskelett und beeinflusst zelluläre Signalwege sowie die Rezeptorlokalisation (Emson et al. 2010; Blandini 2010). Ebenso wie für den AMPA-Rezeptor wurde eine Zunahme der Leitfähigkeit des NMDA-Rezeptors nach Phosphorylierung beschrieben. Es wurde gezeigt, dass D1-Rezeptor-Aktivität die Phosphorylierung der NR2B-Untereinheit steigert und so die Lokalisation und Zusammensetzung von NMDA-Rezeptoren beeinflusst (Di Maio et al. 2016; Fiorentini et al. 2006). Angriffspunkte für die Phosphorylierung bieten die NR1- und NR2-Untereinheit. Dabei kann NR1 am C-terminalen Serin 890/896 durch die PKC und an Serin 897 durch die Proteinkinase A moduliert werden. Die Phosphorylierung von NR2 findet vor allem an Thyrosin statt (Betarbet et al. 2004; Dunah et al. 2000).

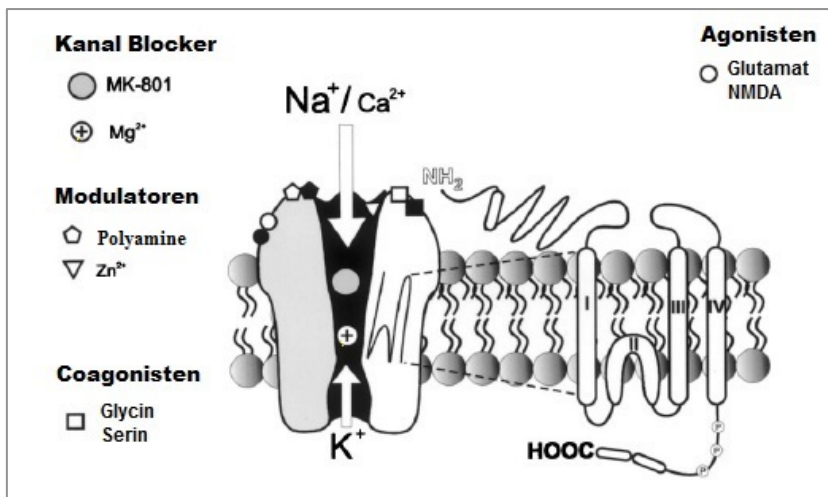


Abbildung 5: Aufbau des NMDA-Rezeptors

Jede Untereinheit besteht aus vier Domänen (I, II, III, IV). Es existieren mehrere Bindungsstellen für regulierende Liganden wie Polyamine und Zink. Der NMDA-Kanal ist durch ein Magnesium-Ion blockiert. Glycin und D-Serin sind Coagonisten des Rezeptors. Modifiziert aus: Bisaga und Popik 2000.

Im Striatum sind NMDA-Rezeptoren hauptsächlich postsynaptisch auf GABAergen Projektionsneuronen und cholinergen Interneuronen lokalisiert (Samuel et al. 1990), siehe Abbildung 6. Man findet vor allem NR1-, NR2A- und NR2B-Untereinheiten (Dunah et al. 2000). Ein präsynaptischer Sitz auf dopaminergen nigrostriatalen Projektionsneuronen wurde in mehreren Studien postuliert (Tarazi et al. 1998b; Wheeler et al. 1995; Wüllner et al. 1994; Tallaksen-Greene et al. 1992). Postmortem Studien an Gehirnen von Parkinson-Patienten hingegen, ließen nicht auf einen Sitz der NMDA-Rezeptoren auf dopaminergen Enden schließen (Ulas et al. 1994; Holemans et al. 1991). Ein präsynaptischer Sitz auf kortikostriatalen Projektionsneuronen wird uneinheitlich diskutiert. Mehrere Studien gehen von einer Regulation der Glutamat-Ausschüttung an kortikostriatalen Synapsen durch präsynaptische NMDA-Rezeptoren aus (Tarazi et al. 1998b). Im Gegensatz dazu postulierten Samuel et al. 1990 einen rein postsynaptischen Sitz an kortikostriatalen Synapsen. Untersuchungen der hippocampalen Afferenzen, ergaben einen präsynaptischen Sitz des NMDA-Rezeptors an hippocampo-striatalen Synapsen (Tarazi et al. 1998a).

Da NMDA-Rezeptor-Antagonisten einen Schutz vor glutamaterger Überstimulation bieten, wird ihnen ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben (Chotibut et al. 2014; Olney 1995). Aufgrund der zahlreichen Expression der NMDA-Rezeptoren im Gehirn ist eine unselektive Hemmung der Rezeptoren jedoch mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden, weshalb nach Medikamenten mit selektiven Angriffspunkt gesucht wird. So konnte im Tiermodell eine antiparkinsonoide Wirkung von selektiven NR2B-Antagonisten nachgewiesen werden. Dabei wirkten sich NR2B-Antagonisten, ebenso wie der NMDA-Antagonist Amantadin, positiv auf L-DOPA-induzierte Dyskinesien aus.

Klinische Studien und die Suche nach weiteren Angriffspunkten sind Gegenstand aktueller Forschungen (Gardoni und Di Luca 2015; Loschmann et al. 2004).

1.3.5 mGlu2/3-Rezeptoren

mGlu2- und mGlu3-Rezeptoren bilden die Gruppe II der mGlu-Rezeptoren. Als Autorezeptoren regulieren sie präsynaptisch die Transmitterausschüttung an glutamatergen Synapsen. Für mGlu3-Rezeptoren wurde zusätzlich eine Expression auf Gliazellen, die eine wichtige Rolle in der Glutamataufnahme und -synthese spielen, beschrieben (Senkowska und Ossowska 2003; Cartmell und Schoepp 2000). Mithilfe der beiden genannten Mechanismen regulieren sie die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung von synaptischer Plastizität sowie in der Pathogenese der Exzitotoxizität (Pin und Duvoisin 1995). Zusätzlich zum glutamatergen System sind mGlu2/3-Rezeptoren in der Lage weitere Transmittersysteme zu regulieren. So wurde unter anderem ein Einfluss auf die Ausschüttung von GABA und Dopamin im ZNS beschrieben (Cartmell und Schoepp 2000). Weiterhin findet man mGlu3-Rezeptoren auf postsynaptischen Membranen (Nicoletti et al. 2011).

Die Gruppe II der mGlu-Rezeptoren sind Gi-gekoppelte Rezeptoren. Dabei kommt es nach Rezeptoraktivierung zu einer GTP-induzierten Dissoziation der Untereinheiten des G-Proteins, welche intrazelluläre Signalwege aktivieren (vgl. Abbildung 3). Weiterhin wurde eine Hemmung von N-Typ-Calcium-Kanälen und eine Aktivierung von Kalium-Kanälen beschrieben (Caraci et al. 2012; Senkowska und Ossowska 2003).

Im Striatum sitzen mGlu-Rezeptoren der Gruppe II hauptsächlich auf den Enden kortikostriataler und thalamostriataler Projektionsneuronen und reduzieren dort die glutamaterge Transmitterausschüttung (Almaric et al. 2013), siehe Abbildung 6. Die Regulation der synaptischen Plastizität wird dabei vor allem den mGlu2-Rezeptoren zugewiesen. Dabei geht man von einem extrasynaptischen Sitz aus (Sgambato-Faure und Cenci 2012). So wurde postuliert, dass es erst mit pathologisch hoher Glutamat-Ausschüttung oder im Rahmen des Prozesses der Langzeitdepression zur Aktivierung der mGlu2-Rezeptoren kommt (Ossowska et al. 2002; Cartmell und Schoepp 2000). Als Heterorezeptoren sitzen mGlu2-Rezeptoren auch auf nigrostriatalen Afferenzen und cholinergen Interneuronen. Während mGlu2-Rezeptoren selektiv auf präsynaptischen Membranen exprimiert werden, wurde für mGlu3-Rezeptoren zusätzlich ein postsynaptischer Sitz auf striatalen GABAergen Projektionsneuronen beschrieben. Des Weiteren findet man mGlu3-Rezeptoren im Striatum auf Gliazellen (Conn et al. 2005; Testa et al. 1998).

In den letzten Jahren wurden mGlu2/3-Rezeptoren vermehrt als mögliches Therapieziel verschiedener neuronaler Erkrankungen untersucht. So wurde eine neuroprotektive, anxiolytische und antiparkinsonoide Wirkung von Gruppe II-Agonisten postuliert (Almaric et al. 2013; Richards et al. 2005; Cartmell und Schoepp 2000). Auch ein potentieller Einsatz von mGlu2/3-Rezeptoragonisten als antipsychotische Medikamente wurde diskutiert (Nicoletti et al. 2011). Die antiparkinsonoide Wirkung von mGlu2/3-Rezeptoragonisten wurde jedoch nicht auf ihren Sitz im Striatum, sondern auf die zusätzliche Expression im STN zurückgeführt, wo sie an subthalamonigralen Afferenzen die Glutamat-Ausschüttung regulieren (Ossowska et al. 2002). Weiterhin konnte eine Neuroprotektion durch Gruppe II-Agonisten nach Hirnschäden gezeigt werden (Byrnes et al. 2009). Diese neuroprotektive Wirkung wurde vor allem mit dem Sitz der mGlu3-Rezeptoren auf Gliazellen in Verbindung gebracht (Caraci et al. 2012).

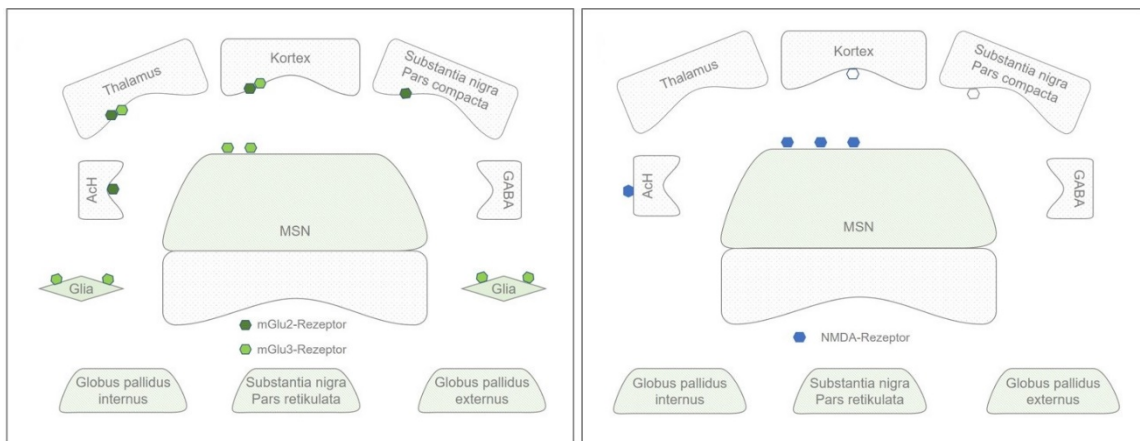


Abbildung 6: Verteilung der mGlu2/3- und NMDA-Rezeptoren im Striatum

Zusammenfassung, der aus der Literatur bekannten Angaben zum Sitz auf präsynaptischen (gebogen) und postsynaptischen (gerade) Membranen. Dabei sind mehrfach publizierte Lokalisationen farbig und kontrovers diskutierte farblos dargestellt. MSN: Hauptprojektionsneuron des Striatums; ACh: cholinerges Interneuron; GABA: GABAerges Interneuron.

1.4 Quantitative Rezeptorautoradiographie

Die Autoradiographie ist eine Methode zur fotografischen Darstellung chemischer Strukturen. Grundlegendes Prinzip ist die Exposition strahlensensibler Medien mit radioaktiv markierten Molekülen. Als radioaktive Substanzen dienen typischerweise β -Strahler, zum Beispiel Tritium (Rainbow et al. 1982a).

Nach anfänglichem Einsatz der Rezeptorautoradiographie in-vivo, entwickelten Young und Kuhar 1979 die in-vitro-Rezeptorautoradiographie für pharmakologische Hirnanalysen. Seitdem wurde die Methode stetig weiterentwickelt.

Anfänglich wurden mit einer photosensiblen Emulsion beschichtete Deckgläser als strahlensensibles Medium genutzt (Young und Kuhar 1979). Rainbow et al. ersetzten diese durch [^3H]-sensitive LKB-Ultrafilme, was eine Quantifizierung der Autoradiogramme mithilfe von Densitometern ermöglichte (Rainbow et al. 1982b). So trifft die quantitative Autoradiographie eine Aussage über die Menge an radioaktiv markierten Molekülen, die auf das strahlensensible Medium eingewirkt haben. Voraussetzung dafür ist der Einsatz von radioaktiven Standards mit bekannter Gesamtradioaktivität, da gezeigt wurde, dass die Anzahl exponierter Silberkörner eines strahlensensiblen Mediums logarithmisch, und nicht etwa linear, mit der Menge an Radioaktivität ansteigt (Rainbow et al. 1982a). Die für die Auswertung benötigten Standards wurden ursprünglich aus homogenisierten Kortex-Gewebe, das mit unterschiedlichen Radioaktivitätsmengen inkubiert wurde, hergestellt (Unnerstall et al. 1982). Mittlerweile werden industriell angefertigte Standards genutzt (Bauer et al. 2005). Im Verlauf der Jahre wurde eine computerbasierte Densitometrie entwickelt (Zilles et al. 1986; Rainbow et al. 1982a). So erfolgt die Bestimmung von optischen Dichten der Autoradiogramme heutzutage mithilfe eines Programmes zur Bildanalyse. In dieser Arbeit nutzen wir das Programm MCID Analysis v7.0, welches in zahlreichen autoradiographischen Studien eingesetzt wurde (Richards et al. 2005; Tarazi et al. 2000; Zavitsanou et al. 1996). Die quantitative Rezeptorautoradiographie wird, neben der Verwendung im Tiermodell, bereits seit mehreren Jahrzehnten zur Untersuchung der Verteilung von Transmitterrezeptoren im menschlichen Gehirn eingesetzt (Zilles et al. 2004; Zilles et al. 1988).

1.5 6-OHDA-Modell der Ratte (Hemiparkinsonratte)

Das 6-Hydroxydopamin(6-OHDA)-Modell der Ratte wurde als eines der ersten Tiermodelle zur Darstellung der pathologischen Vorgänge des Morbus Parkinson entwickelt. Es ist bis heute, neben dem 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin(MPTP)-Modell des Primaten, eines der meist genutzten Modelle im Rahmen der Parkinson-Forschung. Alle aktuellen Parkinsonmedikamente zeigten ihre Wirkung im 6-OHDA-Modell. Ihm wird somit ein hoher prädiktiver Wert für die Vorgänge im MPTP-Modell des Primaten und später auch des Menschen zugesprochen. Dabei wird das Hauptmerkmal der Krankheit, eine Degeneration der nigrostriatalen Neurone, durch intrazerebrale Injektion eines hydroxylierten Dopamins induziert (Blandini et al. 2008). Erstmals wurde das Modell 1968 durch Ungerstedt et al. beschrieben. Sie zeigten eine anterograde Degeneration des nigrostriatalen, dopaminergen Systems nach 6-OHDA-Injektion in die SNpc (Ungerstedt 1968). 6-OHDA führt über die Förderung von oxidativem Stress und die Beeinträchtigung mitochondrialer Funktionen zum Untergang katecholaminerger Neurone.

Die Injektion in das Rattenhirn erfolgt klassischerweise einseitig in die SNpc oder das mediale Vorderhirnbündel (MFB), welches von nigrostriatalen Fasern auf ihrem Weg zum Striatum gebildet wird (Duty und Jenner 2011). Am Läsionsort erfolgt die Aufnahme des Toxins in die dopaminergen Enden über einen Dopamin-Transporter (DAT). Nach Aufnahme in die Neurone akkumuliert 6-OHDA im Zytosol, induziert die Bildung freier Radikale und hemmt antioxidativ-wirkende Substanzen wie zum Beispiel Glutathion. Zusätzlich beeinträchtigt es die Funktionen der mitochondrialen Atmungskette, durch Hemmung von Komplex I und IV (Duty und Jenner 2011; Blandini et al. 2008). Neben seiner Affinität zum DAT, kann 6-OHDA auch an noradrenergen Neuronen mithilfe von Transportern aufgenommen werden. Zur Steigerung der Wirkung auf dopaminerge Neurone, wird die Aufnahme in noradrenerge Neurone vor Injektion in der Regel durch systemische Desipramin-Gabe gehemmt (Duty und Jenner 2011). Nach Injektion von 6-OHDA kommt es innerhalb von 12 Stunden zum Zelltod nigraler Neurone und leicht verzögert, nach zwei bis drei Tagen, zum Untergang der dopaminergen Enden und reduzierter Dopamin-Ausschüttung im Striatum (Blandini et al. 2008). Der Läsionserfolg kann durch Messung der Tyrosinhydroxylaseaktivität oder der Menge von DAT im Striatum geprüft werden. Üblicherweise werden zudem Rotationstests durchgeführt, denn infolge einer 6-OHDA-Läsion zeigen Ratten ein charakteristisches Rotationsverhalten nach systemischer Gabe von Dopamin-Agonisten (Blandini et al. 2008). Dabei führt Apomorphin, ein direkter Agonist des Dopamin-Rezeptors, zu kontralateralen Rotationen entgegen der Läsionsseite. Ursache dafür ist ein größerer Effekt des Agonisten an Rezeptoren der läsionierten Seite, da es hier nach Denervierung zu einer Hochregulation der Rezeptoren kommt (Duty und Jenner 2011). In Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten sich neun Rotationen pro Minute (Wree et al. 2011). Dabei treten die genannten Rotationen erst nach einer vollständigen (> 90 %) Degeneration dopaminerge Neurone auf. Amphetamin hingegen wirkt als indirekter Agonist und induziert an der Präsynapse eine gesteigerte Dopamin-Ausschüttung. Es wirkt somit über Beeinflussung intakter Synapsen, was sich in einer gesteigerten Wirkung auf der kontralateralen Seite zeigt. Folglich kommt es zu ipsilateralen Rotationen in Richtung der Läsionsseite. Diese treten schon bei einer partiellen Läsion (50 - 60 % Zellverlust) auf. Zur Überprüfung einer vollständigen Läsion sollte demnach der Apomorphin-Rotationstest angewandt werden (Duty und Jenner 2011). Neben der klassischen kompletten Läsion wird manchmal auch eine Teilläsion zur Untersuchung früher Krankheitsstadien oder nicht-motorischer Symptomen eingesetzt (Duty und Jenner 2011; McDowell und Chesselet 2012). Dafür wird 6-OHDA direkt in das Striatum injiziert.

Im Vergleich zur klassischen Läsion schreitet die nigrostriatale Degeneration so langsamer voran und es wird lediglich ein Zellkörper-Verlust von 50 - 60 % erreicht. Der subakute Verlauf der Degeneration ermöglicht außerdem Studien zur Testung neuroprotektiver Substanzen (Blandini et al. 2008). An dieser Stelle sei erwähnt, dass neben dem 6-OHDA-Modell weitere etablierte Modelle existieren, die in dieser Arbeit mit Verweis auf die entsprechende Literatur jedoch nicht weiter thematisiert werden (siehe Duty und Jenner 2011). Die wesentlichen Vorgänge des Morbus Parkinson werden im 6-OHDA-Modell gut dargestellt. Die Nachteile des Modells sind das Fehlen von Lewy-Körperchen und die unnatürlich schnelle Degeneration der Neurone. Des Weiteren zeigt das Modell nur einen Ausschnitt der komplexen Veränderungen im Rahmen der Erkrankung, da es lediglich die pathologischen Vorgänge in den Basalganglien darstellt. Für unsere Studie stellt die isolierte Darstellung der Basalganglien jedoch ein optimales Modell zur Untersuchung einer intrastriatalen BoNT/A-Injektion dar. Wir setzten das klassische Modell einer einseitigen, kompletten Läsion des nigrostriatalen Systems, durchgeführt am MFB, ein.

1.6 Botulinumneurotoxine

1.6.1 Eigenschaften

BoNT sind hoch wirksame Neurotoxine, die durch ein zu den sporenbildenden, grampositiven Anaerobiern gehörendes Bakterium (*Clostridium botulinum*) produziert werden. Dabei werden 7 verschiedene Serotypen (BoNT/A - BoNT/G) unterschieden. Die Sporen der Clostridien sind hitzestabil und resistent gegen Umwelteinflüsse. Beim Menschen löst die Intoxikation mit BoNT eine als Botulismus bekannte Erkrankung aus. Nach Aufnahme des Toxins im Magen-Darm-Trakt, wird es über die Blutbahn zu seinem primären Wirkort, der motorischen Endplatte, transportiert. Durch Hemmung der Transmitter-Ausschüttung an cholinergen Synapsen führt es zu schlaffen Lähmungen der peripheren Muskulatur, die sich bis auf die Atemmuskulatur ausbreiten können. Über zusätzliche Hemmung der ACh-Ausschüttung an glatter Muskulatur, führt es außerdem zu gastrointestinalen Störungen wie Mundtrockenheit und Schluckbeschwerden (Matak und Lackovic 2014).

Das Toxin-Molekül besteht aus einer leichten und einer schweren Kette, die über Disulfidbrücken und weitere nicht-kovalente Kontakte miteinander verbunden sind. Dabei vermittelt die schwere Kette den Transport des Toxins in das Zytosol des Neurons. Die leichte Kette fungiert als Zink-abhängige Metalloprotease (Caleo et al. 2009). An der motorischen Endplatte wird BoNT über Dynamin-abhängige Endozytose in die präsynaptischen Enden der cholinergen Neurone aufgenommen.

Dabei induziert die schwere Kette über ihr C-Terminal die Bindung an die präsynaptische Membran. Innerhalb des Endosoms, kommt es pH-abhängig zur Änderung der Toxin-Konformation. Dabei vermittelt die schwere Kette die Freisetzung der leichten Kette in das Zytosol. Über Spaltung einzelner Komponenten des SNARE-Komplexes durch die leichte Kette, verhindert BoNT die Verschmelzung der ACh-transportierenden Vesikel mit der Plasmamembran und somit die Transmitter-Freisetzung. Dabei unterscheiden sich die Angriffspunkte der einzelnen Toxine. BoNT/A und E spalten das Protein SNAP-25. Die Botulinumtoxine Typ B, D, F und G spalten das Vesikel-assoziierte Protein Synaptobrevin (Matak und Lackovic 2014; Davletov et al. 2005).

1.6.2 Einsatz in der Medizin

Seit der ersten Beschreibung einer therapeutischen Wirkung von BoNT/A auf gesteigerte Muskelaktivität im Rahmen von Spastik im Jahre 1970, wurde der Einsatz des Toxins in weiten Gebieten der Medizin erforscht. Schon früh wurde BoNT/A zur Therapie des Strabismus, Blepharospasmus und Hemispasmus facialis genutzt. Im Rahmen dieser Anwendungen wurde die korrigierende Wirkung des Toxins auf Alterserscheinungen der Haut erkannt. Der Einsatz von BoNT/A in der ästhetischen Medizin verzeichnet seit Beginn des 21. Jahrhunderts große Erfolge (Davletov et al. 2005). Auf die ausführliche Darstellung weiterer zahlreicher Indikationen (z.B. Therapie von zervikalen Dystonien, einer hyperaktiven Blase, oder Hyperhidrose), wird in dieser Arbeit mit Verweis auf die umfangreiche Literatur der letzten Jahre verzichtet (Dressler 2013; Naumann et al. 2013; Thenganatt und Fahn 2012). Aktuelle Forschungen beschäftigen sich mit dem Einsatz des Toxins in der Schmerztherapie. Dabei wurde mehrfach eine analgetische Wirkung bei Schmerzerkrankungen, wie zum Beispiel Migräne oder neuropathischen Schmerzen beschrieben (Matak und Lackovic 2014).

Neben ihrer Wirkung an cholinergen Synapsen, wurde im Rahmen von in-vitro-Experimenten an Synaptosomen mehrfach eine Wirkung von BoNT an weiteren Transmittersystemen beschrieben. So hemmen BoNT unter anderem auch die Transmitterausschüttung an glutamatergen, dopaminergen, serotonergen und noradrenergen Synapsen (Thyssen et al. 2010; Verderio et al. 2007; Ashton und Dolly 1988). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse, wird in den letzten Jahren der mögliche Einsatz von BoNT im ZNS erforscht. Dabei verspricht man sich einerseits die Möglichkeit der gezielten Untersuchung komplexer Vorgänge im ZNS, durch selektive Blockade einzelner Systeme. Andererseits wird ein therapeutischer Einsatz bei neurologischen Erkrankungen untersucht (Davletov et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass BoNT/A und E bevorzugt die Transmitterausschüttung an exzitatorischen Synapsen hemmen. Auf das GABAerge System scheinen sie nur bedingt Einfluss zu haben.

Die Ursache für diese Selektivität bleibt unklar, mehrfach wurde aber eine wichtige Rolle des Zielproteins SNAP-25 postuliert (Verderio et al. 2007).

Das hohe therapeutische Potential dieser Selektivität wurde in mehreren Studien aufgegriffen. Es eröffnet die Möglichkeit des Einsatzes von BoNT bei Erkrankungen, in deren Pathogenese eine gesteigerte Aktivität exzitatorischer Synapsen eine Rolle spielt. So wurde im Tiermodell der mesialen Temporallappen-Epilepsie gezeigt, dass eine einseitige BoNT/E Injektion in den Hippocampus einerseits die Entwicklung von Anfällen vorbeugt und andererseits die Anfallshäufigkeit bei chronischer Epilepsie reduziert. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Überaktivität des glutamatergen Systems, ohne Beeinflussung von GABAergen Synapsen (Costantin et al. 2005). Neben dem möglichen Einsatz in der Therapie von Epilepsien, wird außerdem eine neuroprotektive Wirkung des BoNT/E im Rahmen von Ischämien untersucht. Mehrfach wurde eine gesteigerte Glutamat-Ausschüttung nach Ischämie als Ursache des Neuronenuntergangs beschrieben. In einem Tiermodell des ischämischen Schlaganfalls wurden gesteigerte Glutamatkonzentrationen, sowie Zelluntergang nach Ischämie, erfolgreich durch BoNT/E-Injektion verhindert (Antonucci et al. 2010).

Die beschriebenen Erkenntnisse geben Ausblick auf einen möglichen Einsatz der BoNT in der Therapie von Erkrankungen des ZNS. Voraussetzung dafür ist jedoch der Ausschluss einer Beeinträchtigung lebenswichtiger Hirnfunktionen. So wurde in den Studien von Costantin et al. eine Einschränkung der hippocampalen Funktion nach BoNT/E-Injektion beschrieben. Zusätzlich zu den ausgelösten Veränderungen am Wirkort sind weitere Einflüsse von BoNT zu berücksichtigen. So scheint das Zielprotein SNAP-25 neben seiner fundamentalen Rolle bei der Transmitterausschüttung auch am Transport von Rezeptoren in die Plasmamembran beteiligt zu sein (Cheng et al. 2013). Mehrfach wurde zudem eine Regulation von spannungsabhängigen Ionenkanälen durch SNAP-25 beschrieben (Zamponi 2003). Außerdem existieren neben SNAP-25 möglicherweise weitere Zielproteinen der BoNT (Verderio et al. 2007). Neben dem direkten Einfluss auf die genannten Strukturen, kann das Toxin durch Ausbreitung in weitere Hirnbereiche zudem Einfluss auf zentrale Hirnfunktionen nehmen. So wurde eine mögliche Ausbreitung des Toxins durch axonalen Transport und Transzytose beschrieben (Restani et al. 2011). Demnach bedarf es für ein umfassendes Verständnis der Auswirkung einer intrazerebralen BoNT-Injektion auf das ZNS, weiterer Untersuchungen.

1.6.3 Potentielle Anwendung bei Morbus Parkinson

BoNT finden wie oben beschrieben seit Jahren Einsatz in der Therapie von Erkrankungen, die mit einer gesteigerten ACh-Ausschüttung einhergehen (Verderio et al. 2007). Cholinerge Überaktivität spielt auch in der Pathogenese des Morbus Parkinson eine wesentliche Rolle (Pisani et al. 2007). Eine positive Wirkung von Anticholinergika auf die Symptome des Morbus Parkinson ist lange bekannt. Umfangreiche systemische Nebenwirkungen schränken den Einsatz dieser Medikamente jedoch stark ein (vgl. Kapitel 1.1.5). Ein selektiver Angriff an cholinergen Synapsen der Basalganglien, stellt somit eine vielversprechende Therapieoption dar. So wurde in einer Studie unserer Arbeitsgruppe erstmals gezeigt, dass intrastriatale BoNT/A-Injektion sich positiv auf die motorischen Symptome von Hemiparkinsonratten auswirkt (Wree et al. 2011). Dabei verhindert BoNT/A die Apomorphin-induzierten Rotationen der Hemiparkinsonratte konstant und reproduzierbar, für einen Zeitraum bis zu sechs Monaten (Antipova et al. 2013; Wree et al. 2011). Zur Untersuchung weiterer Auswirkungen des Toxins wurde die einseitige BoNT/A-Injektion in das Striatum ebenfalls an gesunden Ratten untersucht. Dabei zeigte sich keine Auswirkung auf die Größe des Nucleus caudatus oder auf die Gesamtzahl der Neuronen im Striatum. Es konnten keine zellulären Immunreaktionen gezeigt werden (Antipova et al. 2013). Auch ein Jahr nach Injektion zeigte sich keine Veränderung der Anzahl cholinergischer Interneurone, was einen zytotoxischen Effekt der BoNT/A-Injektion auf das Striatum der Ratte unwahrscheinlich macht (Mehlan et al. 2016). Eine befürchtete Ausbreitung des Toxins in weitere Teile des Gehirns konnte nicht nachgewiesen werden (Holzmann et al. 2012). Somit könnte die intrastriatale BoNT/A-Injektion in das Striatum eine neue Therapieoption des Morbus Parkinson sein (Mehlan et al. 2016).

1.7 Fragestellung der Arbeit

Zum weiteren Verständnis der Vorgänge nach einer BoNT/A-Injektion in das Striatum, wurde in dieser Arbeit erstmalig die Auswirkung auf die Rezeptordichte von Glutamatrezeptoren mithilfe der quantitativen Rezeptorautoradiographie untersucht.

Eine Reduktion der Glutamat-Ausschüttung an Synapsen nach BoNT-Gabe wurde mehrfach gezeigt (siehe Kapitel 1.6.2). Das Prinzip einer Hochregulation von Rezeptoren, als Reaktion auf reduzierte Konzentrationen ihrer Liganden, ist allgemein bekannt. Somit stellten wir uns zu Beginn unserer Messungen folgende zentrale Frage:

1. Inwieweit beeinflusst eine intrastriatale BoNT/A-Injektion die Dichte von Glutamatrezeptoren im Striatum?

Zusätzlich untersuchten wir den Einfluss der intrastriatalen BoNT/A-Injektion auf die Dichte von Glutamatrezeptoren im 6-OHDA-Modell der Ratte. Zunächst stellten wir dafür die isolierte Auswirkung einer 6-OHDA-Läsion auf die Rezeptordichte und im Anschluss die Veränderungen durch zusätzliche intrastriatale BoNT/A-Injektion dar. Dabei stellten wir uns folgende Fragen:

1. Inwiefern kommt es im Rahmen dopaminerger Denervierung des Striatums zu Veränderung der Dichte von Glutamatrezeptoren?
2. Wie wirkt sich eine intrastriatale BoNT/A-Injektion auf die Dichte von Glutamatrezeptoren im 6-OHDA-Modell aus?

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Bei den in diesem Projekt eingesetzten 127 Tieren, handelte es sich um männliche, drei Monate alte Wistar Ratten der Firma Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden zu dritt in Kunststoffkäfigen mit Metallgitteraufsätzen gehalten. Nahrung und Wasser wurden uneingeschränkt zur Verfügung gestellt. Durch Regulation der Beleuchtung wurde ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus geschaffen. Die Haltung, sowie Zucht und Experimente, erfolgten stets unter Wahrung des Tierschutzes gemäß Tierschutzgesetz. Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch die zuständige Behörde (Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-003/13).

2.2 Narkose der Tiere

Alle Operationen am Rattenhirn wurden unter Narkose durchgeführt. Die Tiere wurden mit einem intraperitoneal injizierten Gemisch aus Ketamin (50mg/kg KG) und Xylazin (4mg/kg KG) narkotisiert.

2.3 Einteilung der Tiere in fünf Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in fünf Versuchsgruppen eingeteilt. Innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen wurde der zeitliche Verlauf der Veränderung von Rezeptordichten erfasst, in dem die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet wurden. Gruppe L wurde lediglich mit 6-OHDA läsioniert. Die Tiere der Gruppe LB wurden 6 Wochen nach 6-OHDA-Läsion mit BoNT/A behandelt, Gruppe LV erhielt nach gleicher Zeit eine Botulinumtoxin-Ersatzlösung zur Untersuchung der generellen Auswirkung einer Manipulation in dem Injektionsareal. Gruppe B wurde mit BoNT/A behandelt ohne vorherige 6-OHDA-Läsion. Gruppe K diente als unbehandelte Kontrolle (vgl. Tabelle 5, siehe Anhang).

2.4 Unilaterale Läsion des medialen Vorderhirnbündels mit 6-OHDA

Die Läsionen wurden von Prof. Dr. A. Wree durchgeführt. Dabei wurden die narkotisierten Tiere (vgl. 2.2) zur gezielten Injektion in einer stereotaktischen Apparatur (David Kopf, Tujunga, CA, USA) fixiert. Die Eröffnung der Kopfschwarte erfolgte durch eine sagittale Inzision. Nach Schädeltrepanation mithilfe eines Bohrers wurde die Dura eröffnet. Die Injektion erfolgte in das rechte MFB mit den Zielkoordinaten anterior-posterior= - 2.3 mm, lateral= - 1,5 mm, ventral= - 9,0 mm bezüglich des Referenzpunktes Bregma (Paxinos

et al. 1985). Mithilfe einer Hamiltonspritze wurden 4µl 6-OHDA (24µg), gelöst in 0,1 molarer Citratpufferlösung, über einen Zeitraum von 4 min injiziert.

Dabei wurde von einer vorherigen Desipramin-Injektion zum Schutz der adrenergen Neurone abgesehen, da dies zu einer hohen Mortalität der Versuchstiere führte. Vier Wochen nach 6-OHDA-Injektion wurde der Läsionserfolg mithilfe des Apomorphinrotationstests überprüft. Dabei musste ein Tier mindestens vier Rotationen pro Minute entgegen der läsionierten Seite vollbringen, um als erfolgreich läsioniert gewertet zu werden.

2.5 Intrazerebrale Applikation von Botulinumneurotoxin-A

Die BoNT/A-Injektionen wurden 6 Wochen nach 6-OHDA-Läsion von Prof. Dr. A. Wree durchgeführt. Dafür wurden die Tiere narkotisiert (vgl. 2.2) und in einer stereotaktischen Apparatur fixiert. Es erfolgte eine zweimalige, diskontinuierliche Injektion von 1µl BoNT/A-Lösung (Lot 13028A1A, List, Campbell, USA; Händler: Quadragech, Surrey, UK) an zwei Injektionsorten im Striatum (siehe Abbildung 7). Dabei wurde BoNT/A in einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung mit 0,1 % Rinderserum Albumin (PBS-BSA 0,1 %) gelöst. Insgesamt wurde 1 ng BoNT/A injiziert. Als BoNT-Ersatzlösung diente PBS-BSA 0,1 %.

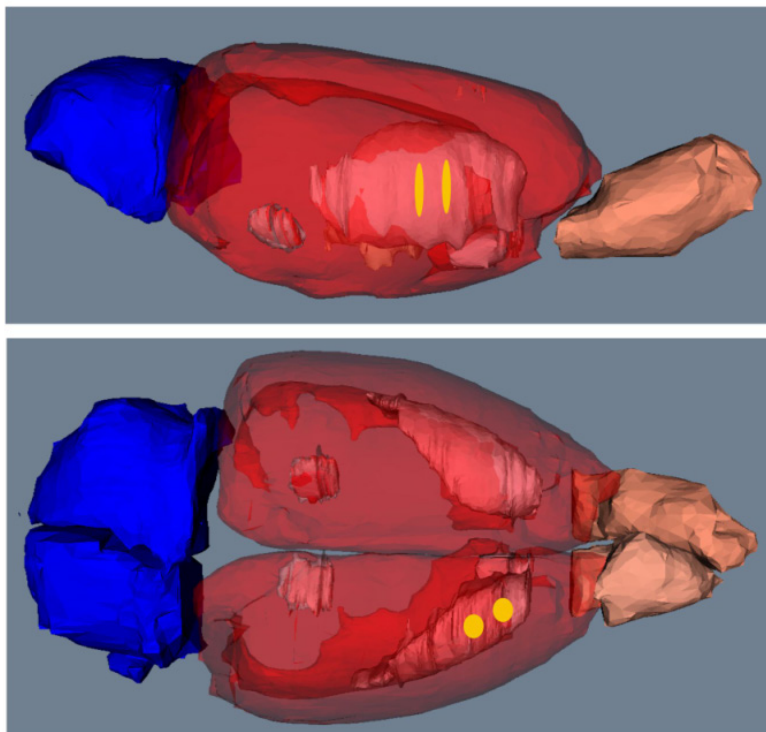


Abbildung 7: Injektionsstellen von BoNT/A im Striatum der Ratte.

Das obere Bild zeigt eine laterale Ansicht, das untere Bild eine dorsale Ansicht des Rattenstriatums. Die gelben Markierungen entsprechen den zwei Injektionsstellen von BoNT/A (anterior= + 1,3/ - 0,4 mm; lateral= - 2,6/-3,6 mm und ventral= - 5,5 mm). Die Abbildung wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. O. Schmitt, Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock.

2.6 Tötung der Tiere und Fixierung der Gehirne

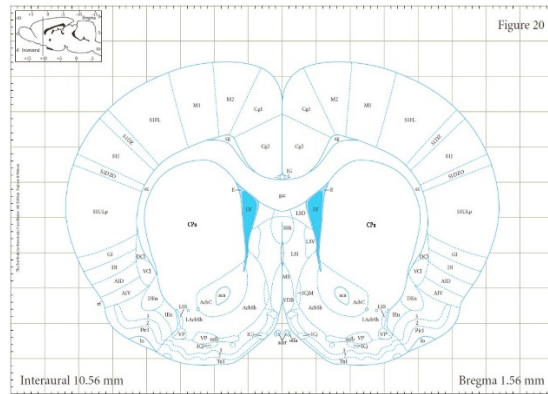
Nach Tötung der Tiere mit einer Überdosis Ketamin/Xylazin wurden die Rattenhirne sofort nach Entnahme in Isopentan eingefroren und anschließend bei -80° C gelagert.

2.7 Aufarbeitung der Gehirne

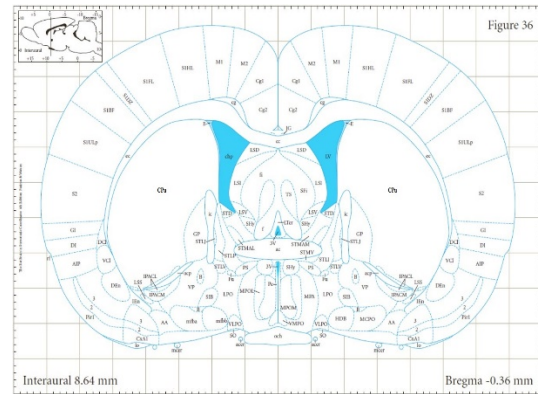
Die Anfertigung der Hirnschnitte erfolgte anteilig durch Mitarbeiter des Forschungszentrums Jülich und des Anatomischen Instituts der Universität Rostock. Der Transport von Gehirnen und Hirnschnitten erfolgte ebenfalls bei einer Temperatur von -80° C.

Die insgesamt 127 Gehirne wurden mithilfe eines Cryostaten (Leica Instrumente GmbH, Wetzlar, Deutschland) koronar geschnitten und direkt von der Klinge auf einen beschichteten Objektträger aufgenommen. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte mit Gelatine. Vor dem Schneiden wurden die Objektträger bei -20° C gelagert.

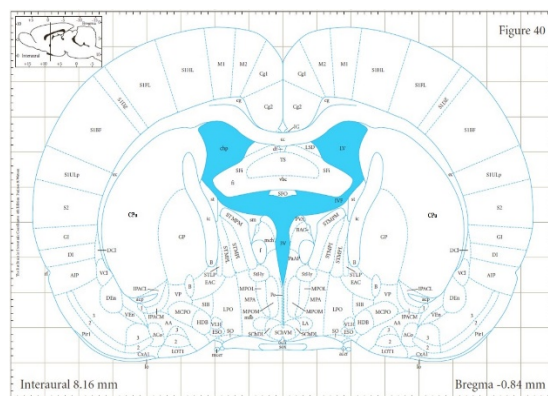
Pro Gehirn wurden sieben Schnittebenen dargestellt. Da in der siebten Schnittebene kein Nucleus caudatus-Putamen (CPu) mehr vorhanden war, wurden nur sechs Schnittebenen gemessen (vgl. Abbildung 8).



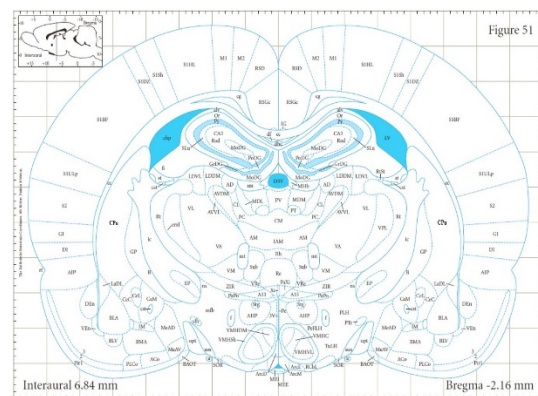
Ebene 1



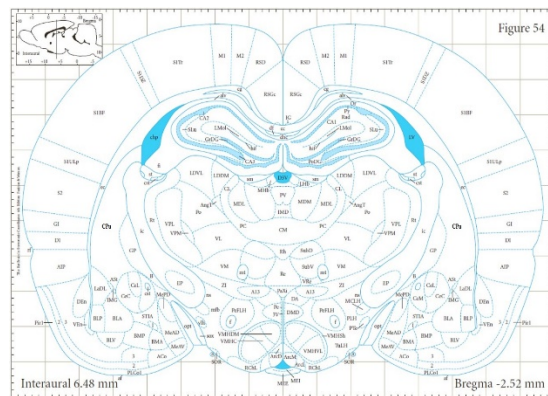
Ebene 2



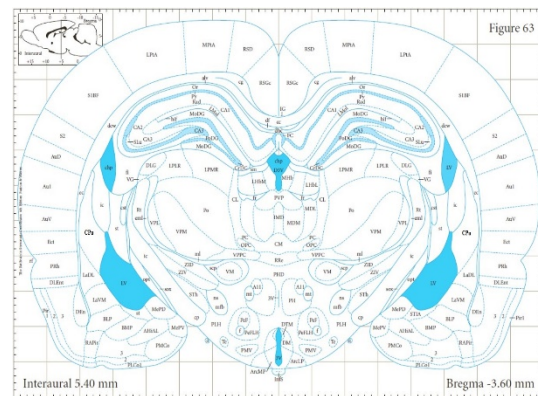
Ebene 3



Ebene 4



Ebene 5



Ebene 6

Abbildung 8: Kartierung der Schnittebenen nach Paxinos und Watson

Atlas „The rat brain in stereotaxic coordinates“, 6th edition, Paxinos and Watson 2007

Ebene 1 (interaural 10.56mm, Bregma +1.56mm), Ebene 2 (interaural 8.64mm, Bregma -0.36mm), Ebene 3 (interaural 8.16mm, Bregma -0.84mm), Ebene 4 (interaural 6.84mm, Bregma -2.16mm), Ebene 5 (interaural 6.48, Bregma -2.52mm), Ebene 6 (interaural 5.40mm, Bregma -3.60mm). Dabei ist der Bezugspunkt Bregma definiert als Schnittpunkt der Pfeil- und Kreuznaht des Rattenschädels

Innerhalb der sieben Schnittebenen wurden je 30 Hirnschnitte mit einer Schnittdicke von 20 µm angefertigt. Neben den in dieser Arbeit untersuchten Glutamatrezeptoren wurden weitere Rezeptoren mit entsprechenden Liganden untersucht, sodass 19 Schnitte der Inkubation mit den unterschiedlichen Liganden dienten. Zwei Schnitte wurden für die beiden histologischen Färbungen genutzt. Die restlichen neun Schnitte wurden als Reserve hergestellt.

Rostral der ersten Schnittebene wurden weitere 30 Schnitte für die Herstellung eines unspezifischen Bindungsbilds angefertigt.

Nach Aufschmelzung der Schnitte auf die gefrorenen Objektträger wurden sie bei 35° C für 20-30 min. getrocknet. Im Anschluss wurden die Schnitte in Kisten sortiert und bei -80° C gelagert.

2.8 Quantitative Rezeptorautoradiographie

Die Rezeptorautoradiogramme wurden im Forschungszentrum Jülich, Institut für Neurowissenschaften und Medizin, nach standardisierten Protokollen entwickelt (Zilles et al. 2002; Zilles et al. 1991a). Dabei wurden die mit dem Cryostat-Microtom hergestellten, unfixierten Schnitte zunächst in einem Liganden-spezifischen Puffer vorinkubiert. Dies diente der Entfernung von im Gewebe verbliebenen Transmittern, um eine Rezeptorblockade mit endogenen Substanzen zu verhindern. Danach folgte die eigentliche Inkubation der Hirnschnitte mit dem jeweiligen Tritium-markierten [³H] Liganden in einem Puffermedium. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden einige Hirnschnitte zusätzlich zum [³H] markierten Liganden auch mit einem in höherer Konzentration vorliegenden, unmarkierten Liganden (Kompetitor) inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte zwei verschiedenen Waschvorgängen unterzogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Inkubationsdauer, Temperatur, Pufferauswahl, das Waschmedium sowie die Konzentration des Liganden und seines Kompetitors waren für jeden Rezeptor spezifisch (siehe Tabelle 6, Anhang).

Nach Markierung der Hirnschnitte mit den radioaktiv markierten Liganden wurden sie auf einen β-strahlenempfindlichen Film (Kodak, Perkin Elmer LAS GmbH, Deutschland) aufgebracht und in Abhängigkeit vom jeweiligen Liganden für 10 bis 15 Wochen im Dunkeln bei 4° C exponiert (vgl. Tabelle 7, siehe Anhang).

Gemeinsam mit den Hirnschnitten wurden Standards aufgebracht. Im Anschluss wurde der Film in einem Fotolabor mit Hilfe eines Hyperprozessors (Amersham Biosciences, Europa) entwickelt. Danach wurden die Filme mithilfe einer CCD-Kamera (Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Deutschland) digitalisiert. Es entstanden Grauwertbilder mit einer Auflösung von 4164*3120 Pixeln und 8-Bit Grauwertauflösung.

Um die Zytoarchitektur der Hirnregionen gut abgrenzen zu können, wurden zusätzlich zu den Autoradiogrammen histologische Präparate angefertigt. Es wurde eine Nissl- und Markscheidenfärbung durchgeführt.

2.9 Auswertung der Rezeptorautoradiogramme mit MCID

Die densitometrische Bestimmung der Rezeptordichten wurde mit dem Programm MCID Analysis v7.0 (InterFocus imaging Ltd, Linton, UK) (<http://www.mcid.co.uk/>) durchgeführt. Bei der Dichtemessung in MCID wird der durchschnittliche Grauwert eines Bildausschnittes einer Ligandenkonzentration zugeordnet. Dies geschieht anhand von standardisierten Kalibrierungskurven. Die Kalibrierungskurven wurden auf Grundlage von Kalibrierungstabellen aus Jülich erstellt. In Jülich wurde durch Messung von „Past“ Standards der Firma ARC, mit bekannter Ligandenkonzentration, jedem mittleren Grauwert, im Wertebereich von 0 bis 255, eine exakte Ligandenkonzentration zugeordnet. Dabei wurde für jede Folie eine eigene Kalibrierungstabelle erstellt.

Die Erstellung der Kalibrierungskurve erfolgte im „Calibration Modus“. Die acht standardisierten Wertepaare der Jülicher Tabelle wurden in MCID übertragen. Als Einheit für die Ligandenkonzentration wurde fmol/mg gewählt. Die Grauwerte wurden in „Levels“ angegeben. Anschließend wurde mittels einer kubischen Spline-Funktion die nichtlineare Transformation der Wertepaare in Form einer interpolierten Kalibrierungskurve dargestellt (siehe Abbildung 9).

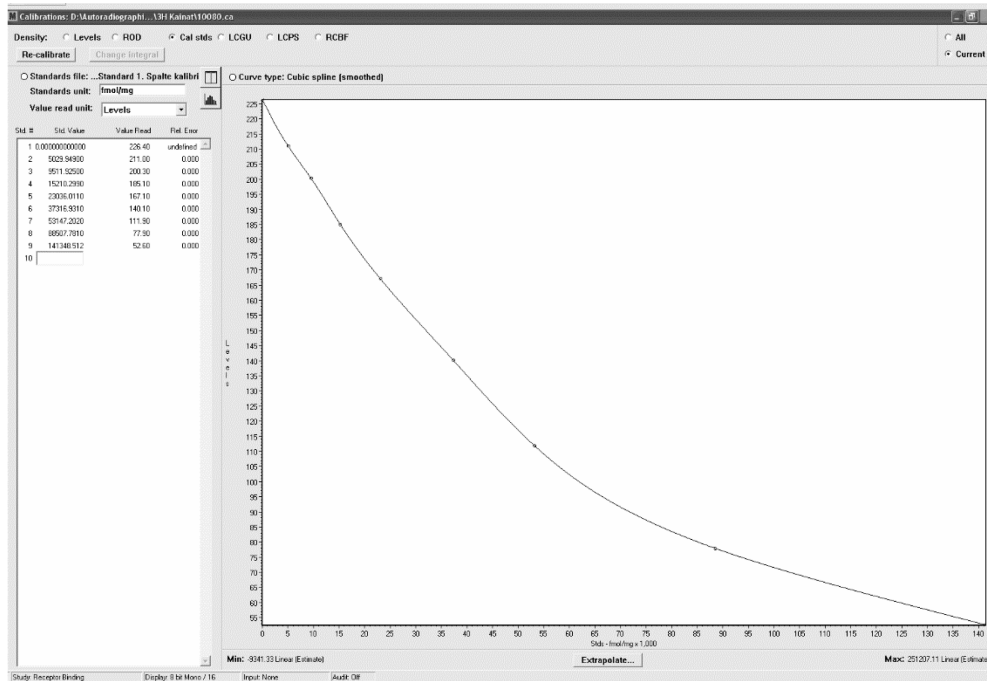


Abbildung 9: Kalibrierungskurve in MCID

Darstellung der Ligandenkonzentration in fmol/mg (x Achse); Grauwert in Levels (y-Achse)

Große Grauwerte erscheinen in den rezeptorautoradiographischen Bildern als hellgraue (ca. 230) bis weiße (ca. 255) Pixel und sind Ausdruck einer niedrigen Ligandenkonzentrationen. Kleine Grauwerte, dunkelgrau (ca. 50) bis schwarz (ca. 0), entsprechen einer besonders hohen Ligandenkonzentration.

Bildbereichen, deren Ligandenkonzentration geringer war als der Betrag des hellsten Grauwertes (255), wurde in der Kalibrierung die Ligandenkonzentration 0 fmol/mg zugeordnet.

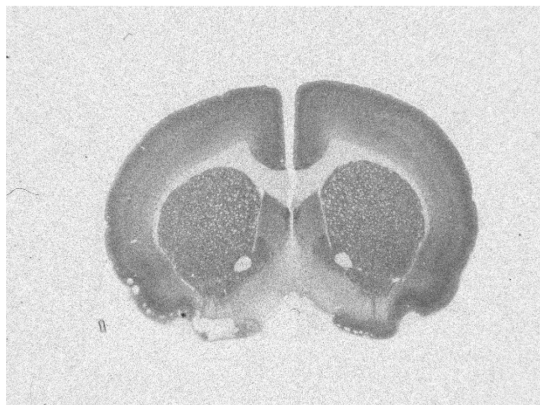
Jedes autoradiographische Bild wurde mit einer Kalibrierungskurve verknüpft. Dafür wurden die „total binding“ Bilder (Gesamtbindungsbilder, tif-Format) in den Messkanal (Kanal 1) von MCID geladen und gemeinsam mit der Kalibrierung als MCID-Bilddateien abgespeichert.

Vor Messbeginn wurde der Wert für die unspezifische Ligandenbindung bestimmt. An dieser Stelle wurde anders als im standardisierten Jülicher Protokoll (Bozkurt 2004) verfahren. Die in Jülich für die Ermittlung der Konzentration spezifischer Rezeptorbindungsstellen hergestellten „unspecific binding“ Bilder wurden, aufgrund zu geringer Korrelation der dargestellten Hirnareale mit dem „total binding“ Bild, nicht genutzt. Stattdessen wurde im ersten „total binding“ Bild der Serie die Ligandenkonzentration des Hintergrundes bestimmt.

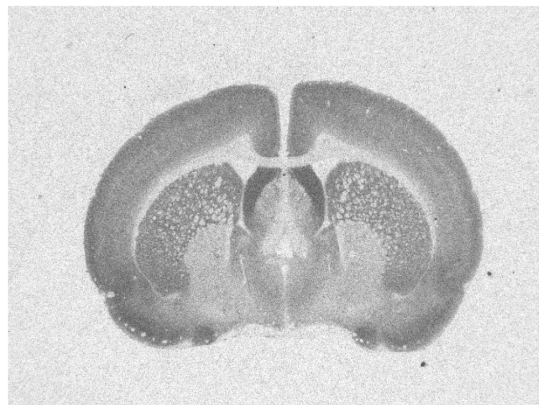
Dafür wurde das kalibrierte Bild in Kanal 1 geladen und nach Auswahl des Icons „set receptor nonspecific binding“ wurde der Hintergrund mithilfe der „outline“-Funktion großzügig umfahren.

Der so ermittelte Wert wurde als konstanter Wert der unspezifischen Bindung in Kanal 2 gespeichert und von jeder gemessenen Ligandenkonzentration subtrahiert. Es wurden so hintergrundkorrigierte Ligandenkonzentrationen gemessen. Falls die ermittelte Ligandenkonzentration des Hintergrundes um mehr als 4 Level von dem als 0 fmol/mg definierten Grauwert abwich, wurde die Kalibrierungskurve für die aktuelle Bildserie geändert. Dafür wurde der gemessene Hintergrundwert der Ligandenkonzentration 0 fmol/mg zugeordnet.

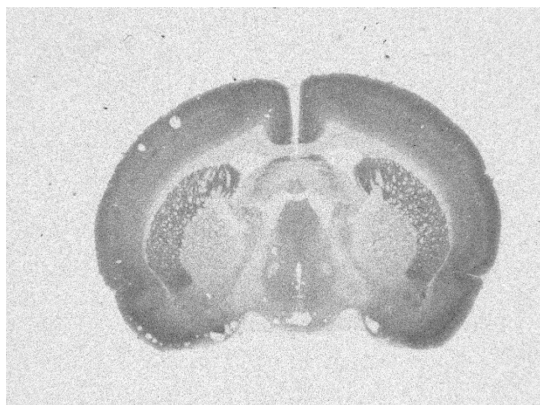
Die Messungen wurden im „Sample Modus“ durchgeführt. Zusätzlich zur hintergrundkorrigierten Ligandenkonzentration wurden die Fläche und der Umfang der gemessenen Region bestimmt. Eine Bildserie bestand aus sieben rezeptorautoradiographischen Bildern, die den Frontalschnitten eines Rattenhirns von rostral nach kaudal entsprachen. Da in der siebten Schnittebene kein CPu mehr vorhanden war, wurden nur die ersten sechs Bilder einer Serie vermessen (siehe Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13).



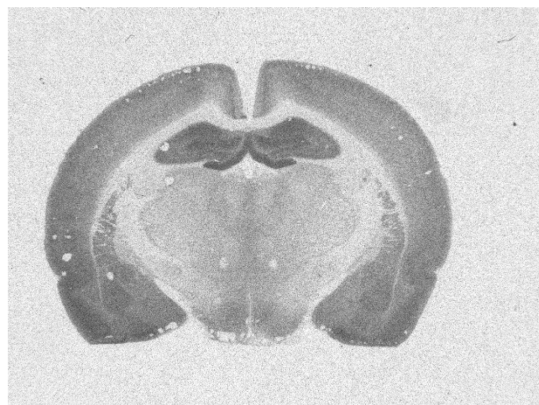
Schnitt 1



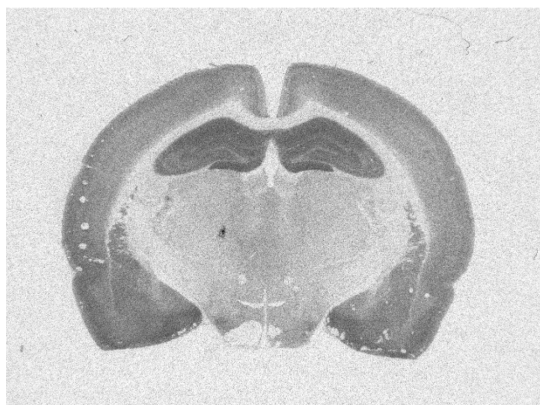
Schnitt 2



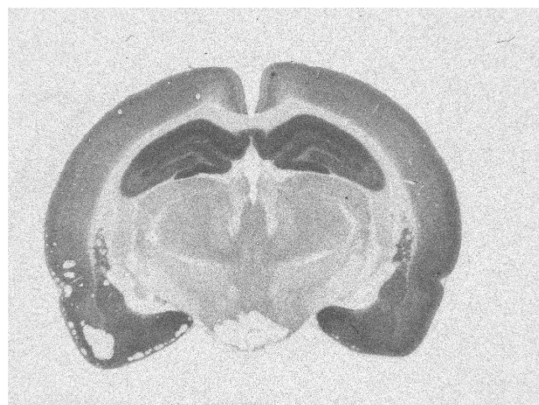
Schnitt 3



Schnitt 4

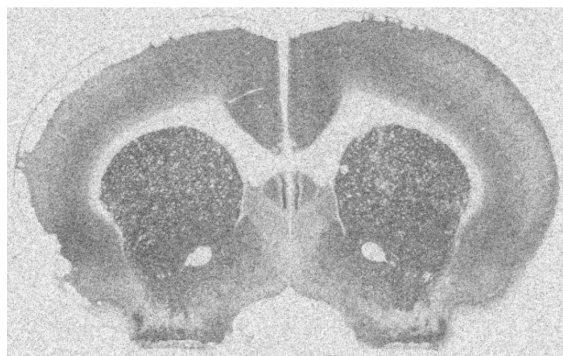


Schnitt 5

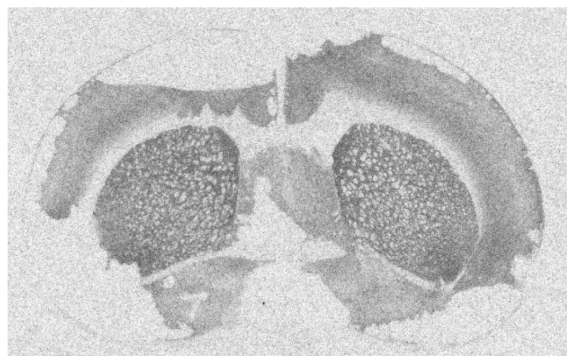


Schnitt 6

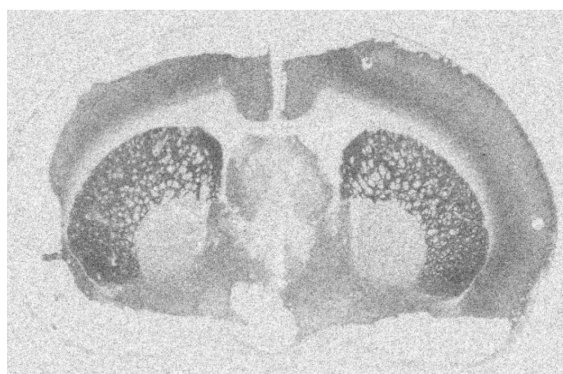
Abbildung 10: Bildserie von rostral nach kaudal markiert mit [3 H]AMPA



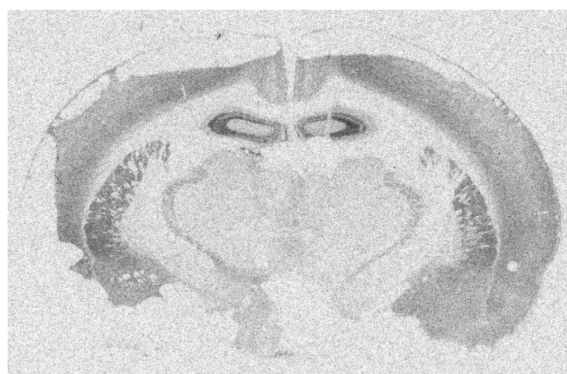
Schnitt 1



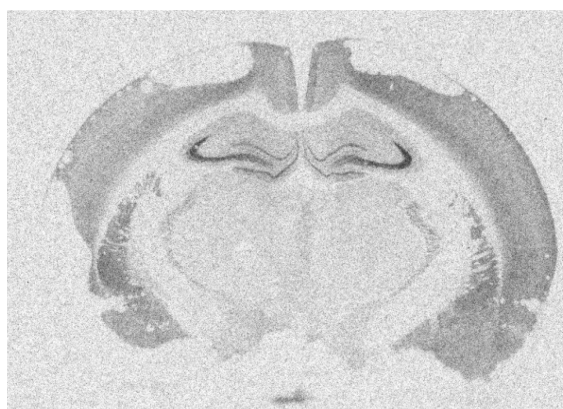
Schnitt 2



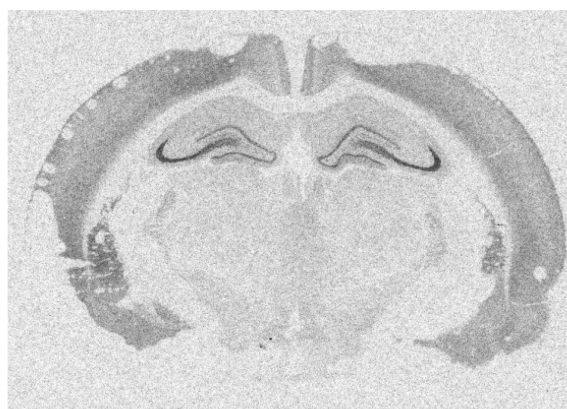
Schnitt 3



Schnitt 4

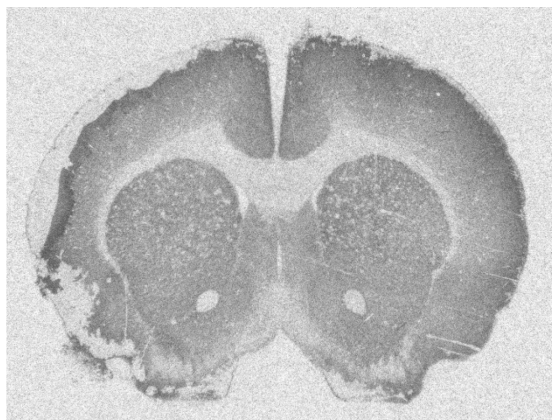


Schnitt 5

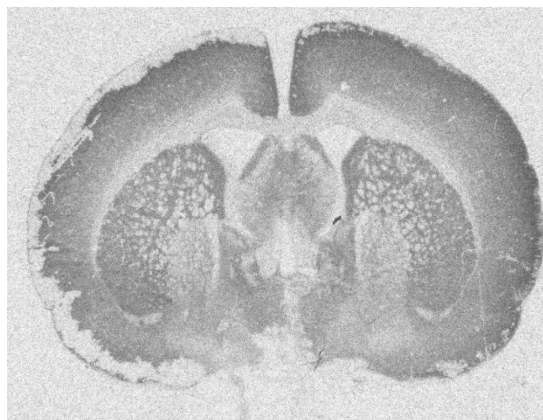


Schnitt 6

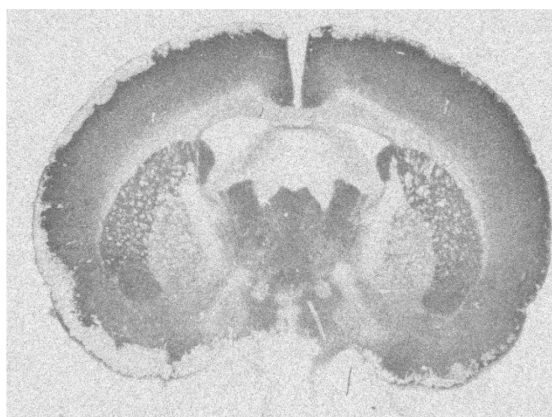
Abbildung 11: Bildserie von rostral nach kaudal markiert mit [^3H]Kainat



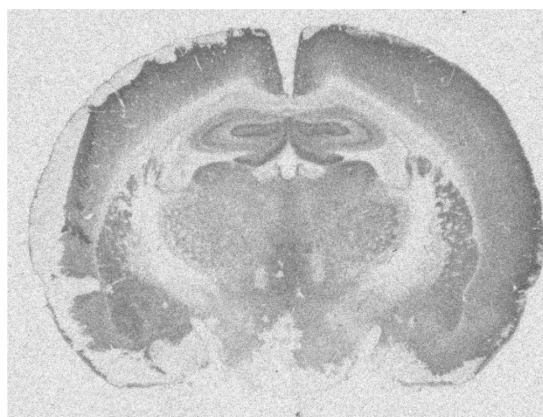
Schnitt 1



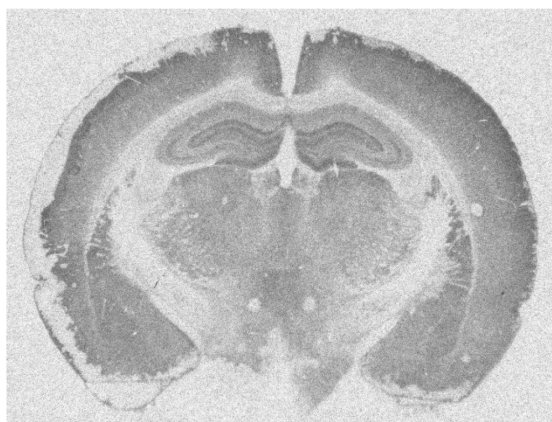
Schnitt 2



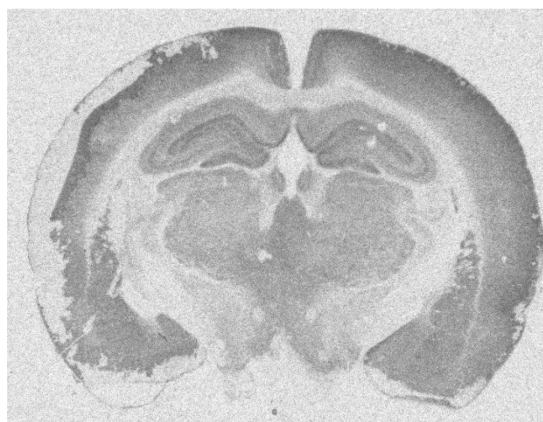
Schnitt 3



Schnitt 4

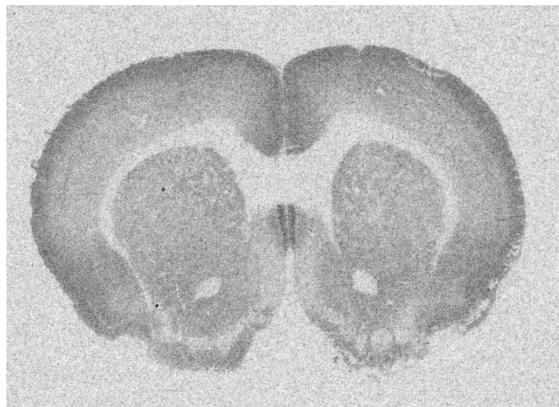


Schnitt 5

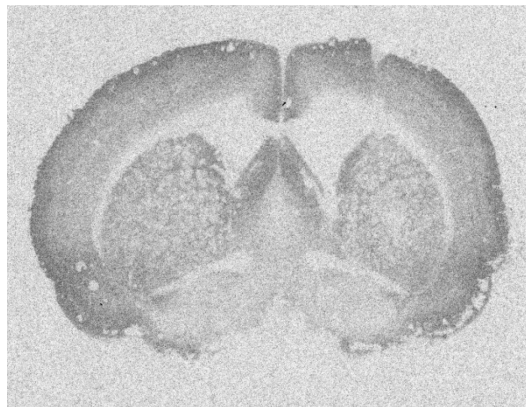


Schnitt 6

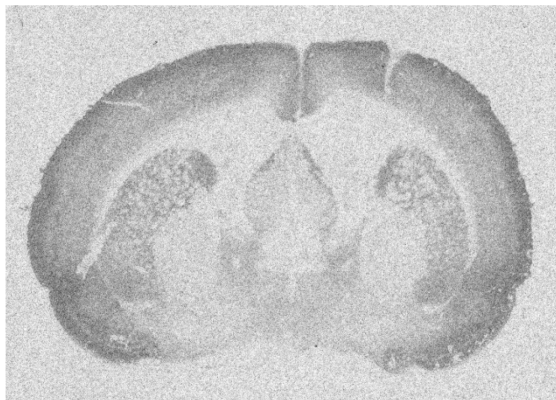
Abbildung 12: Bildserie von rostral nach kaudal markiert mit [³H]LY341



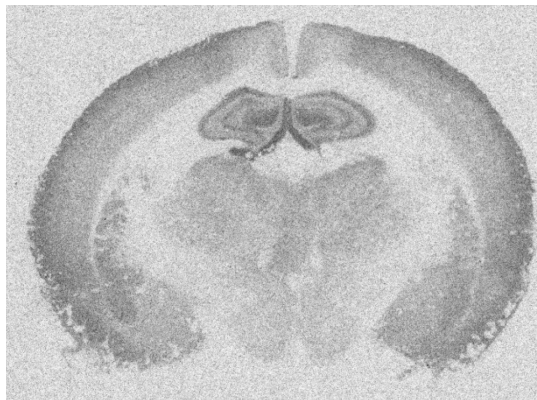
Schnitt 1



Schnitt 2



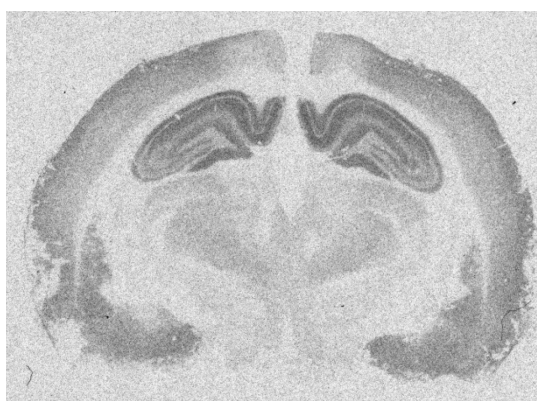
Schnitt 3



Schnitt 4



Schnitt 5



Schnitt 6

Abbildung 13: Bildserie von rostral nach kaudal markiert mit [^3H]MK801

In jedem Bild wurde das rechts- und linkshemisphärische CPu gemessen. Das CPu wurde mit der Maus im Modus „click outline“ umfahren. Die entstandene Konturlinie definierte eine geschlossene Fläche, in der MCID die Ligandenkonzentration ermittelte (siehe Abbildung 14).

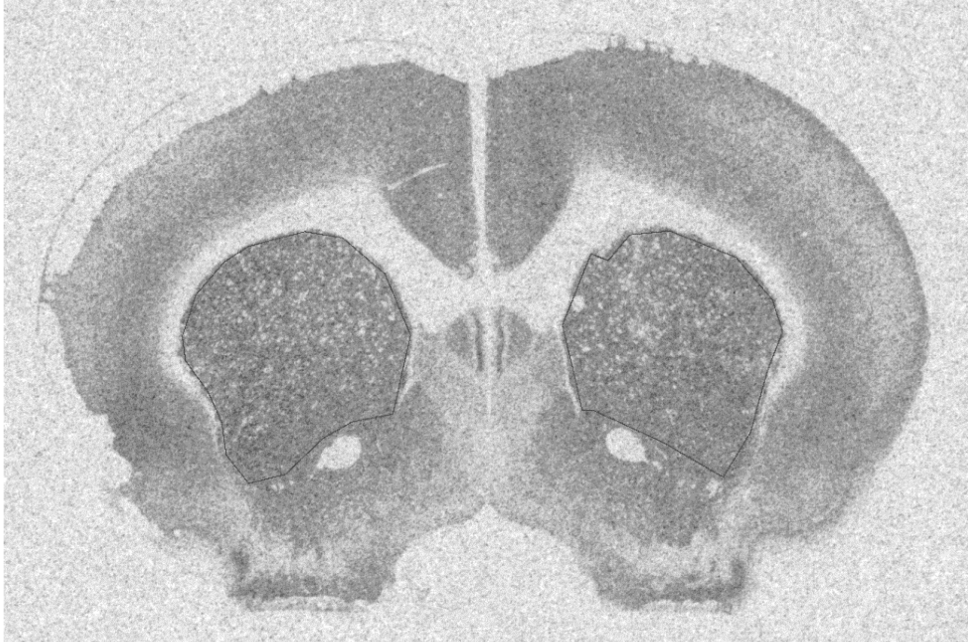
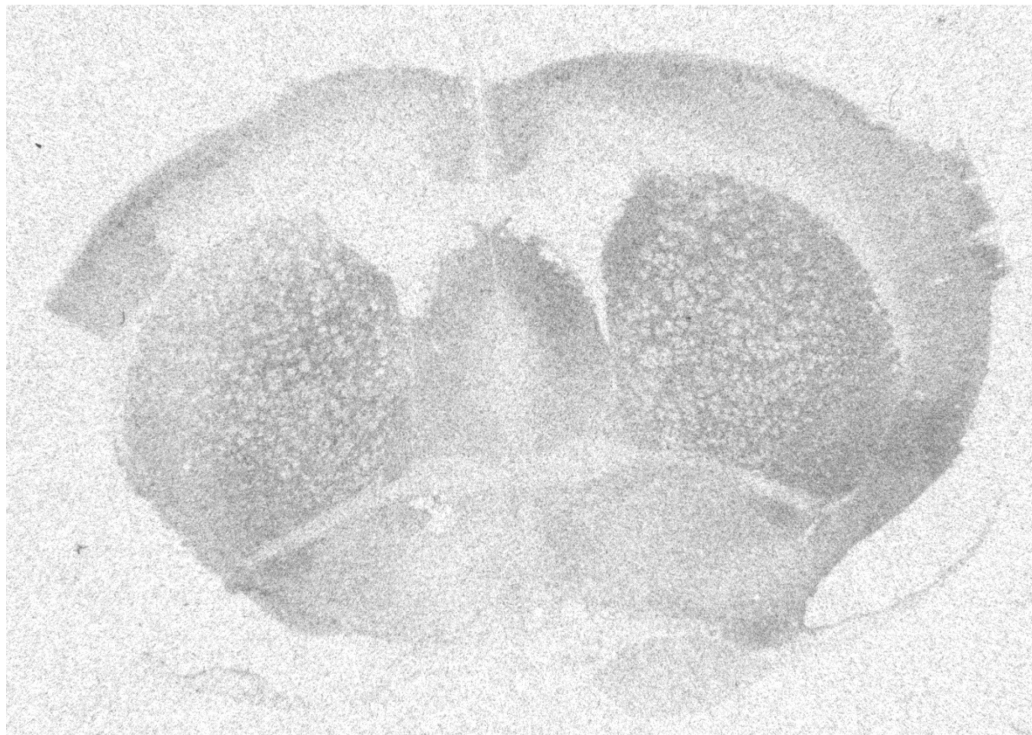


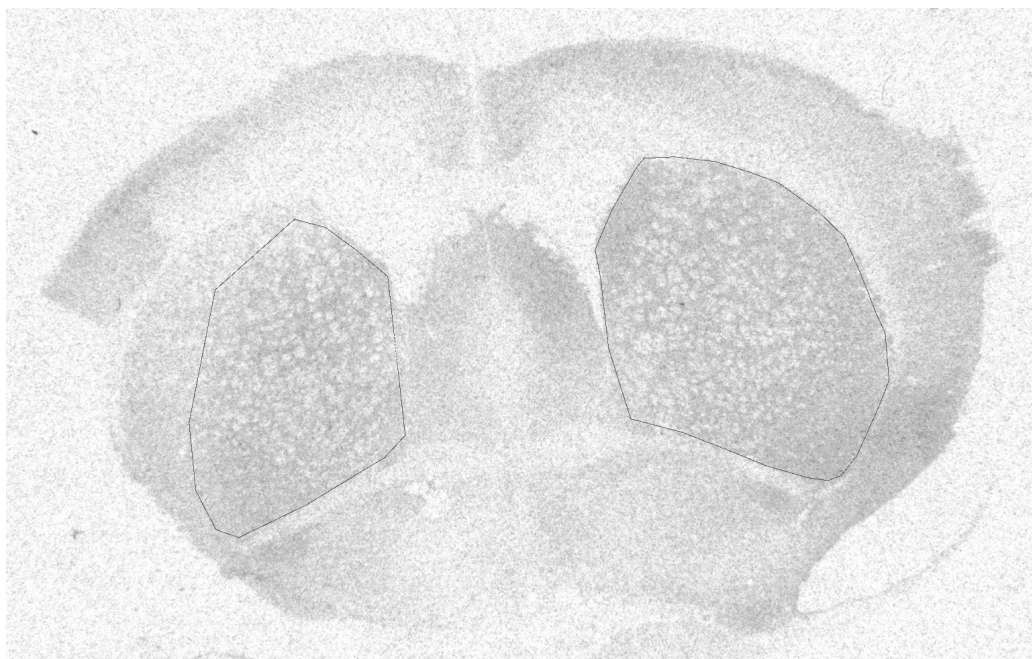
Abbildung 14: Darstellung der in MCID angelegten Konturlinie

In Bildern, deren CPu-Region durch Artefakte oder andere methodenbedingte Qualitätsverluste eine inhomogene Struktur aufwies, wurden nur Anteile des CPus gemessen. Bilder mit stark beschädigter CPu-Region wurden aus der Messreihe genommen.

Abbildung 15 zeigt ein Bild, dessen linke CPu Region einen „Drift“, d.h. Grauwertverlust, von medial nach lateral aufweist. Das linke Striatum wurde unter Aussparung der lateralen Bereiche gemessen. In dem in Abbildung 16 dargestellten Rezeptorautoradiogramm wurde ebenfalls nur ein Teil des linken CPus gemessen. Grund dafür war eine eingeklappte linke Hemisphäre.



A

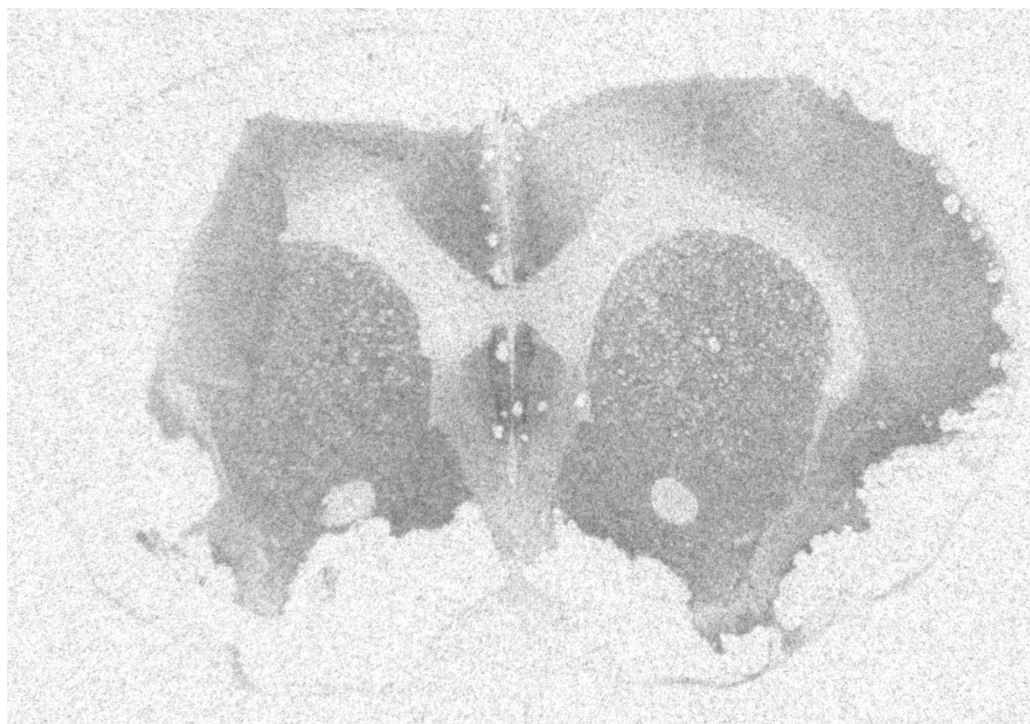


B

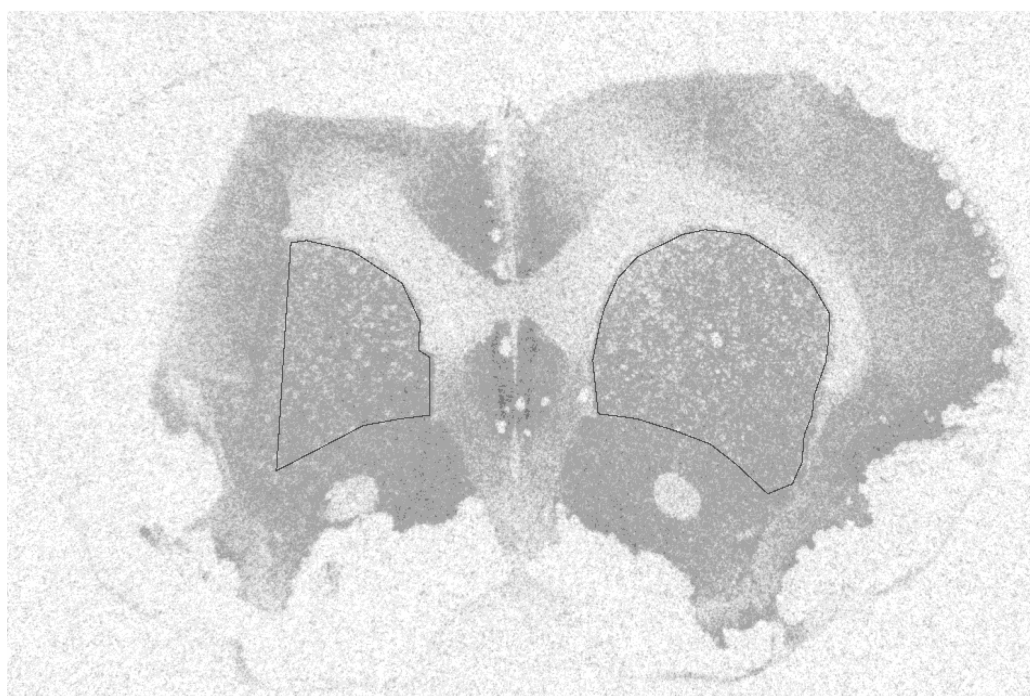
Abbildung 15: Inkomplette Messung des Striatums aufgrund schlechter Bildqualität

A Grauwertabnahme der linken CPu-Region von medial nach lateral

B Darstellung der in MCID gemessenen Region



A



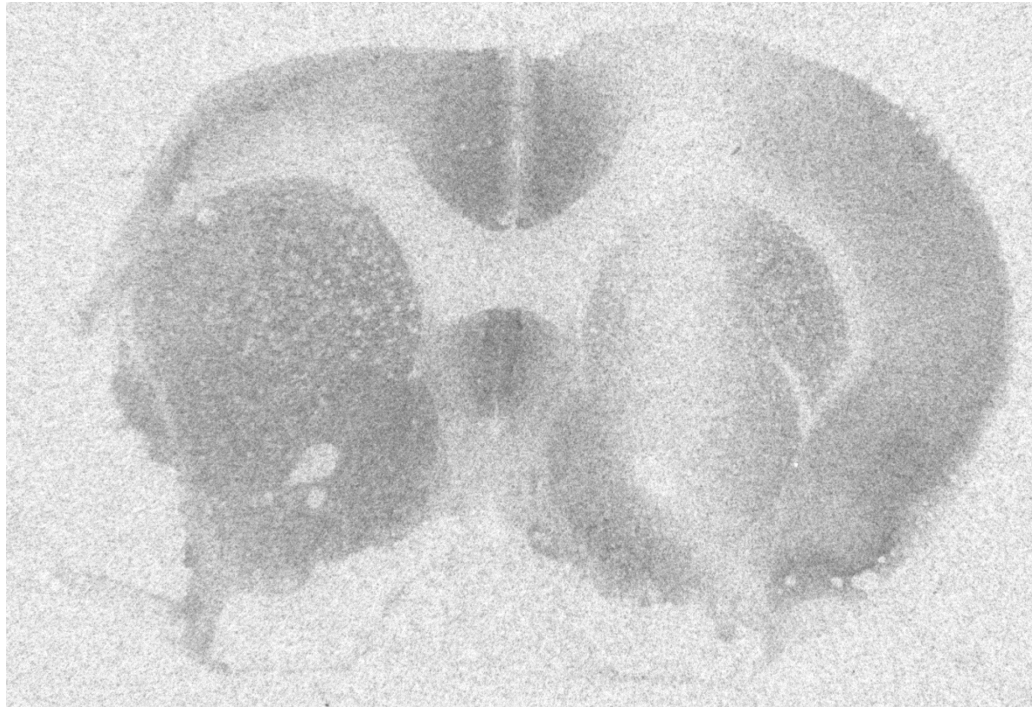
B

Abbildung 16: Inkomplette Messung des Striatums aufgrund Materialüberlagerung

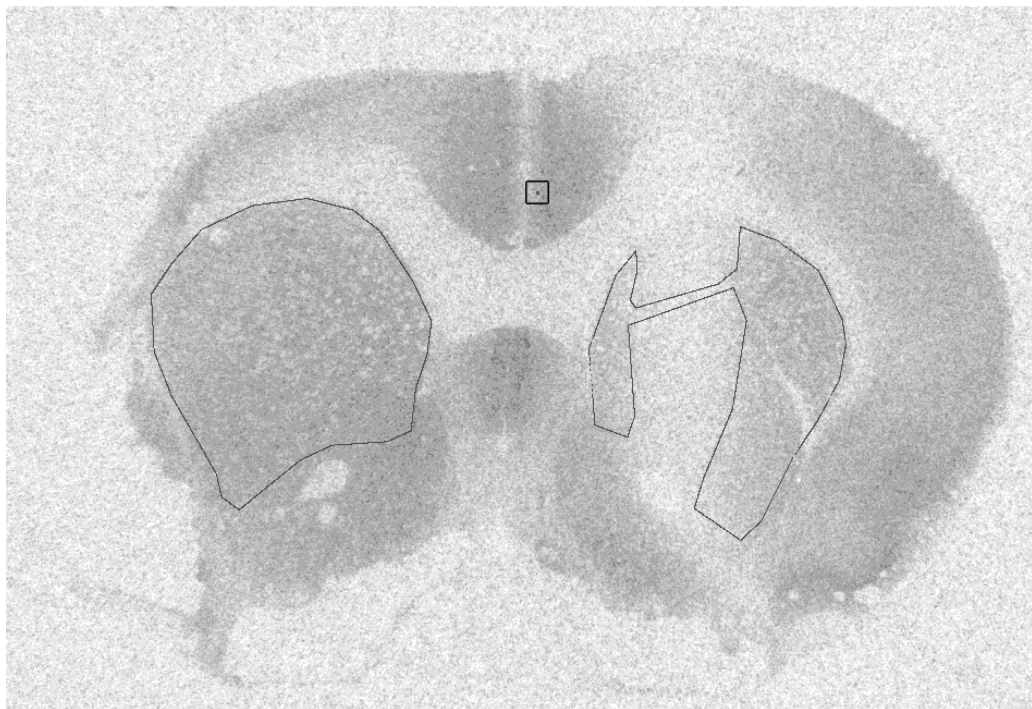
A die linke Hemisphäre ist eingeklappt

B Darstellung der in MCID gemessenen Region

Abbildung 17 zeigt wie mit einem Autoradiogramm verfahren wurde, dessen CPu Region durch ein Artefakt durchsetzt war.



A



B

Abbildung 17: Inkomplette Messung des Striatums aufgrund eines Artefaktes

A die rechte CPu-Region ist durch ein Artefakt durchsetzt

B Anteilige Messung mithilfe einer „Brücke“

Die gemessene Ligandenkonzentration wurde von MCID nach Abzug des unspezifischen Bindungswertes automatisch in eine Ergebnistabelle übertragen. Teilweise ermittelte MCID Ligandenkonzentrationen, in deren Berechnung einzelne Pixel mit einem Helligkeitswert größer als der für 0 fmol/mg definierte Wert eingingen. Diese Werte wurden von MCID rot geschrieben. Da aber ein mittlerer Grauwert aus allen Pixeln bestimmt wurde, konnten diese einzelnen helleren Pixel vernachlässigt werden.

2.10 Ermittlung der Rezeptordichte

Die gemessenen Werte einer Bildserie wurden aus der MCID-Tabelle mit „Kopieren und Einfügen“ nach Sortierung in einer vorgefertigten Libre-Office-Calc-Tabelle in die endgültige Ergebnistabelle eingefügt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die englische Dezimalkommasetzung von MCID korrekt in das deutschsprachige Tabellenkalkulationsprogramm übertragen wurde.

Die gemessenen Ligandenkonzentrationen wurden mit folgender Formel in Rezeptordichten umgerechnet:

$$RD \left[\frac{\text{fmol}}{\text{mg}} \right] = \frac{CG}{SA \left[\frac{\text{Ci}}{\text{mmol}} \right]} \times \frac{Kd [\text{nM}] + L [\text{nM}]}{L [\text{nM}]}$$

Die Rezeptordichte (RD) ergibt sich aus dem mittleren gemessenen kalibrierten Grauwert (CG), der aus MCID in das Tabellenprogramm kopiert wurde, und aus Liganden-spezifischen Konstanten. Die Spezifische Aktivität (SA), Dissoziationskonstante (Kd) und Realkonzentration (L) des jeweiligen Liganden wurden der AUTO_SCAL2C Datei entnommen (siehe Tabelle 8, Anhang). Dabei beschreibt die SA die Strahlungsaktivität des jeweiligen Liganden. Die Kd gibt die halbmaximale Sättigungskonzentration an und ist ein Maß für die Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor. Je kleiner die Dissoziationskonstante, desto höher ist die Affinität. Gleichzeitig stellt die Dissoziationskonstante einen Richtwert für die Ligandenkonzentration im Inkubationsmedium dar. Die Realkonzentration beschreibt die tatsächliche Konzentration im genutzten Inkubationsmedium.

Für jeden Schnitt einer Bildserie wurde so die Rezeptordichte des rechten und linken Striatums bestimmt. Ein Mittelwert der 6 Schnitte wurde gebildet, sodass jedem Tier je eine Rezeptordichte für das rechte und linke Striatum zugeordnet wurde. Anschließend wurden die mittleren Rezeptordichtewerte mit der durchschnittlich gemessenen Fläche verknüpft und in Versuchsgruppen zusammengefasst. Das am Ende erstellte Säulendiagramm bildet die mittleren flächengewichteten Rezeptordichten einer Versuchstiergruppe mit ihrer Standardabweichung ab.

Zusätzlich wurden für jede Versuchstiergruppe Dichtekurven erstellt, um Veränderungen der Rezeptordichte zwischen den rostral und kaudal gelegenen Striatumanteilen zu erkennen. Dafür wurden aus den Einzelwerten der Schnitte Mittelwerte für die jeweilige Schnittebenen gebildet. Die Dichtekurven sind somit eine Darstellung mittlerer Rezeptordichten ohne Flächenwichtung.

Anhand folgender Formel wurde zusätzlich eine relative Rezeptordichte errechnet:

$$\text{Relative Rezeptordichte} = 100 \times \frac{\text{MW area RD rechts} - \text{MW area RD links}}{\text{MW area RD links}}$$

Die Berechnung einer relativen Rezeptordichte diente der Darstellung von möglichen Seitendifferenzen zwischen dem rechten und linken Striatum eines Versuchstiers. Mithilfe des Programmes Origin 8.1 wurden Scatterplots generiert, welche die relativen Rezeptordichten der einzelnen Tiere einer Versuchsgruppe darstellen. Diese Form der Wertedarstellung ermöglicht die Streuung der Werte innerhalb einer Versuchsgruppe zu beurteilen.

2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten wurden mithilfe des Programm IBM SPSS Statistics Version 20 durchgeführt. Zum Wertevergleich der einzelnen, unabhängigen Gruppen wurde eine ANOVA, einfaktorielle Varianzanalyse, durchgeführt. Zuvor wurde die, für die Anwendung dieses parametrischen Testverfahrens, vorausgesetzte Normalverteilung der Daten mithilfe des Kolmogorow-Smirnow Test geprüft. Nach Signifikanznachweis in der ANOVA folgte zur genauen Darstellung der signifikanten Paarvergleiche ein Post-Hoc-Test mit Bonferoni-Korrektur. Dabei wurde, wie allgemein üblich, ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt, d.h. ab einem p-Wert <0,05 galten Ergebnisse als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Einleitung

Zum allgemeinen Überblick zeigt Abbildung 18 die mittlere flächengewichtete Rezeptordichte der einzelnen Glutamaterezeptoren im Striatum der gesunden Ratte. Hierfür wurde für jeden Rezeptor der links- und rechtsseitige mittlere Wert der Kontrollgruppe (n=7) zusammengefasst.

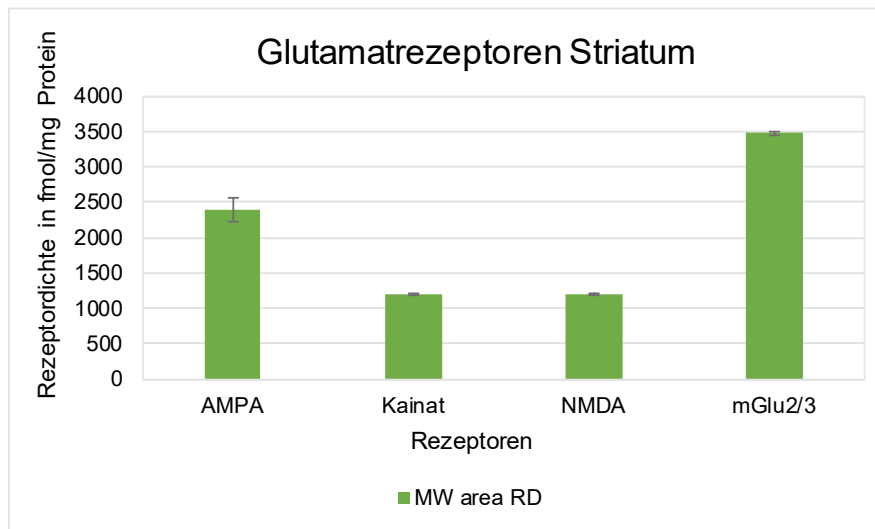


Abbildung 18: Rezeptordichten der Glutamaterezeptoren im Striatum

Es zeigen sich große Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Rezeptoruntergruppen im Striatum. Die größte Rezeptordichte weisen die mGlu2/3-Rezeptoren auf, mit einem durchschnittlichen Wert von 3472 fmol/mg Protein. AMPA-Rezeptoren zeigen eine Rezeptordichte von 2390 fmol/mg Protein, wobei sich die große Standardabweichung aus einem interhemisphärischen Unterschied der Kontrollgruppe ergibt. Deutlich geringere Rezeptordichten ergaben sich für die Kainat-Rezeptoren mit 1189 fmol/mg Protein und NMDA-Rezeptoren mit 1208 fmol/mg Protein.

Nachfolgend sind unsere Ergebnisse der Messung von Rezeptordichten im Striatum für die einzelnen Versuchsgruppen der vier verschiedenen Glutamaterezeptoren ausführlich dargestellt. Dabei unterscheidet man die Gruppe der Hemiparkinsonratten ohne Therapie (Gruppe L) mit verschiedener Überlebenszeit (L3W, L6W, L6W1M etc.), die Gruppe der BoNT/A-therapierten Kontrolltiere (Gruppe B), ebenfalls zu verschiedenen Zeitpunkten, sowie die Gruppe der Hemiparkinsonratten mit zusätzlicher BoNT/A-Therapie (Gruppe LB) zu verschiedenen Zeitpunkten. Außerdem sind zwei Gruppen der Hemiparkinsonratten mit Schein-BoNT/A-Therapie (Gruppe LV) dargestellt.

3.2 AMPA-Rezeptoren

Abbildung 19 zeigt die mittlere AMPA-Rezeptordichte des linken und rechten Striatums der einzelnen Versuchsgruppen. Dabei stellen die Gruppen L, B, LB und LV eine Zusammenfassung der bezüglich der Überlebensdauer unterschiedenen Untergruppen dar. Zum direkten Vergleich ist die Kontrollgruppe mit aufgeführt. Es zeigen sich Unterschiede zwischen den Rezeptordichten der einzelnen Gruppen ($F(9,240)=8.852$; $p=.000$).

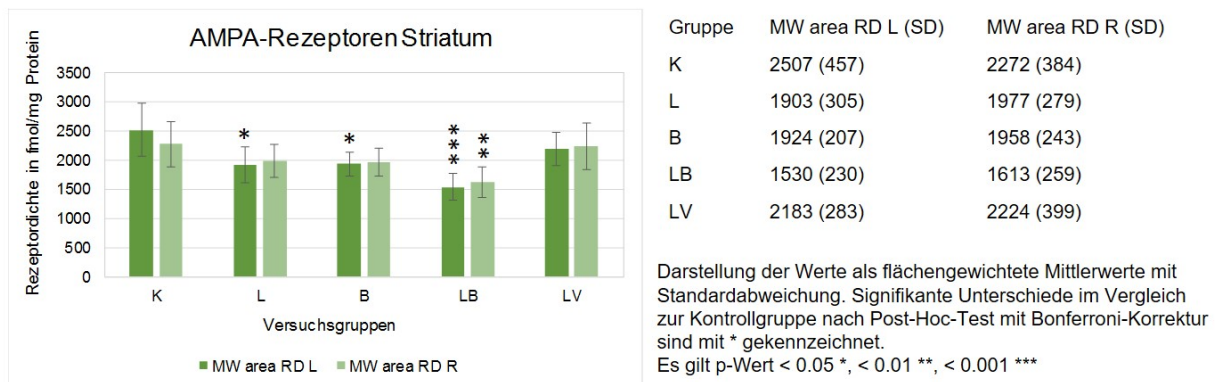


Abbildung 19: AMPA-Rezeptordichten der vier Versuchsgruppen

Auffällig ist ein interhemisphärischer Unterschied von 235 fmol/mg Protein in der Kontrollgruppe, bei einem mittleren Wert von 2507 fmol/mg Protein für das linke und 2272 fmol/mg Protein für das rechte Striatum. Der Unterschied zeigt sich, bei großer Varianz der Werte in Gruppe K des linken Striatums, als statistisch nicht signifikant. In Gruppe L zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe beidseits eine kleinere Rezeptordichte, wobei der Unterschied nur für das linke Striatum signifikant ist ($p=.017$). Innerhalb der Gruppe L zeigt sich kein relevanter interhemisphärischer Unterschied. Nach rechtsseitiger BoNT/A-Injektion in das Striatum (Gruppe B), zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls eine beidseits reduzierte Rezeptordichte ohne interhemisphärischen Unterschied. Signifikanz konnte nur für das linke Striatum nachgewiesen werden ($p=.025$). 6-OHDA-läsionierte Versuchstiere mit anschließender BoNT/A-Therapie (Gruppe LB) weisen beidseits eine signifikant kleinere Rezeptordichte als die Kontrollgruppe auf ($p=.000$, $p=.005$). Die scheinbehandelte Gruppe (Gruppe LV) zeigt keine signifikante Veränderung der Rezeptordichte. Gruppe LB und LV weisen ebenfalls keine Unterschiede zwischen der Rezeptordichte des linken und rechten Striatums auf.

Abbildung 20 stellt die relative Rezeptordichte von AMPA-Rezeptoren im Striatum der einzelnen Versuchstiere aller Versuchsgruppen dar. Zur Berechnung der relativen Rezeptordichte siehe Kapitel 2.10.

Dabei beschreiben negative Werte eine größere Rezeptordichte des linken Striatums, positive Werte entstehen bei Überwiegen des rechten Striatums. Ausbleibende interhemisphärische Differenz führt zu einer relativen Rezeptordichte von null.

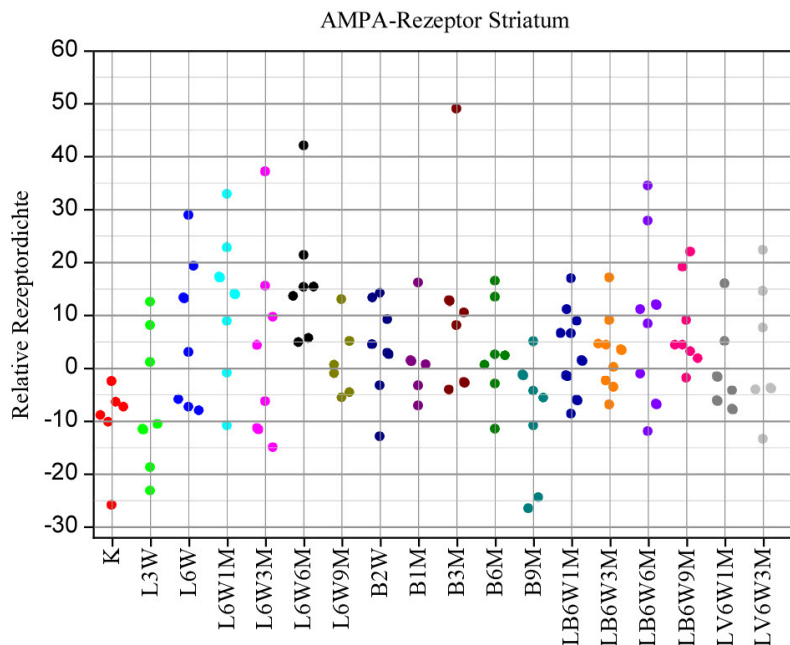


Abbildung 20: Relative AMPA-Rezeptordichten der einzelnen Versuchstiere

Die Kontrollgruppe weist im Vergleich zu den restlichen Gruppen eine geringe Streuung der Einzelwert auf. Dabei liegen alle Werte im negativen Bereich. Auffällig ist ein einzelner Wert von -25 %. Bei Kontrolle der Bilder sieht man eine im Vergleich zum linken Striatum verschwommene, schwächere Darstellung des rechten Striatums. Zusammengefasst stellt sich, wie auch im Säulendiagramm (siehe Abbildung 19), eine linkshemisphärisch betonte Rezeptordichte (im Mittel (\bar{x}) -10 %) dar, die jedoch keinem relevanten Seitenunterschied entspricht. In den läsionierten Gruppen fällt eine breite Streuung der Einzelwerte auf. In Gruppe L6W3M und L6W6M fallen Extremwerte von +37 % und +42 % auf. Bei Bildkontrolle zeigt sich rein visuell jedoch keine Erklärung für diese Werte. Außer einer rechtsbetonten Rezeptordichte in Gruppe L6W1M ($\bar{x} = +12$ %) und L6W6M ($\bar{x} = +17$ %), ist keine Seitendominanz erkennbar. Die Einzelwerte der BoNT/A-therapierten Tiere liegen überwiegend in einem Bereich zwischen -10 % und +20 %. Mit Ausnahme eines Extremwertes von +49 % in Gruppe B3M und zwei auffälligen Werten in Gruppe B9M (-25 % und -27 %), erscheinen die Gruppen homogen mit mittlerer Streubreite. Die zugehörige Bildserie des Extremwertes von Gruppe B3M zeigt keine Artefakte. Für einen der beiden Extremwerte in Gruppe B9M zeigen die entsprechenden Autoradiogramme einen unscharfen Anschnitt des rechten Striatums, die andere Bildreihe erscheint unauffällig. Die Gruppe B2W scheint leicht rechtsbetont ($\bar{x} = +4$ %), in den restlichen Gruppen zeigt sich keine relevante Seitendominanz.

In den Versuchsgruppen der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten zeigt sich keine eindeutige Seitendominanz. Dennoch liegen die Werte in Gruppe LB6W1M (\bar{x} = +3 %), LB6W6M (\bar{x} = +9 %) und LB6W9M (\bar{x} = +8 %) durchschnittlich im positiven Bereich, sind also leicht rechtsbetont. Bis auf Gruppe LB6W6M, die eine weite Streuung aufweist, zeigt sich ein recht homogenes Bild. Die Gruppen der läsionierten und scheinbehandelten Tiere zeigen keine Seitenpräferenz.

In Abbildung 21 sind die mittleren Rezeptordichten der einzelnen Untergruppen von 6-OHDA-läsionierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgetragen.

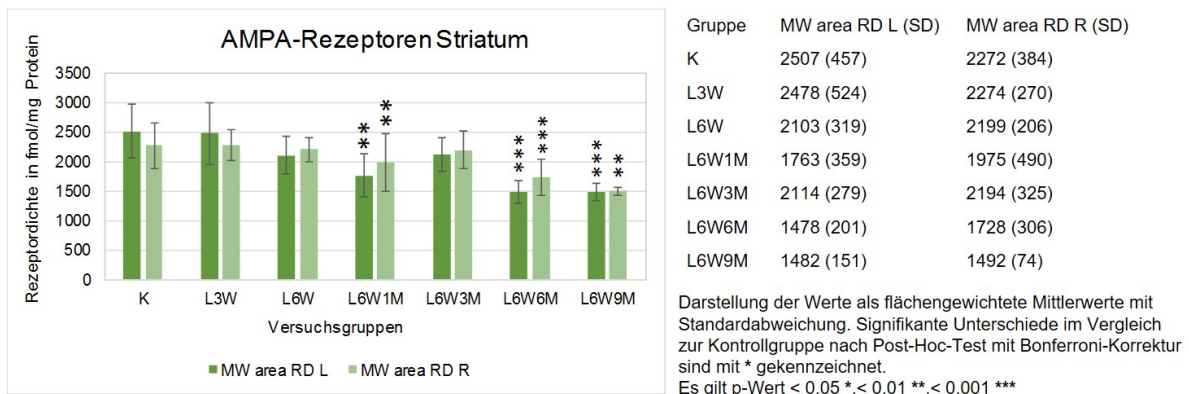


Abbildung 21: AMPA-Rezeptordichten der 6-OHDA-läsionierten Tiere

Drei Wochen nach 6-OHDA-Läsion zeigen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Veränderungen. Die geringfügig niedrigere Dichte des rechten Striatums fällt auch in dieser Gruppe auf. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant und bei großer Standardabweichung des Mittelwertes schwer beurteilbar (vgl. Abbildung 21). Die Gruppen L6W und L6W3M zeigen keine relevanten Veränderungen der Rezeptordichte. Gruppe L6W1M (links p = .003, rechts p = .006), L6W6M (links p = .000, p = .000) und L6W9M (links p = .000, rechts p = .002) weisen im Vergleich zur Kontrollgruppe beidseits geringere Werte auf. Die Seitenunterschiede der Gruppen L6W1M und L6W6M sind unter Beachtung der großen Standardabweichung der Mittelwerte des rechten Striatums, die sich in einer breiten Streuung und dem Auftreten von Extremwerten auch in den zugehörigen Scatterplots darstellt, als nicht relevant anzusehen (vgl. Abbildung 20).

Abbildung 22 zeigt die Auswirkung einer striatalen BoNT/A-Injektion auf die mittlere Rezeptordichte der AMPA-Rezeptoren. Dargestellt sind die einzelnen Gruppen mit unterschiedlicher Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe.

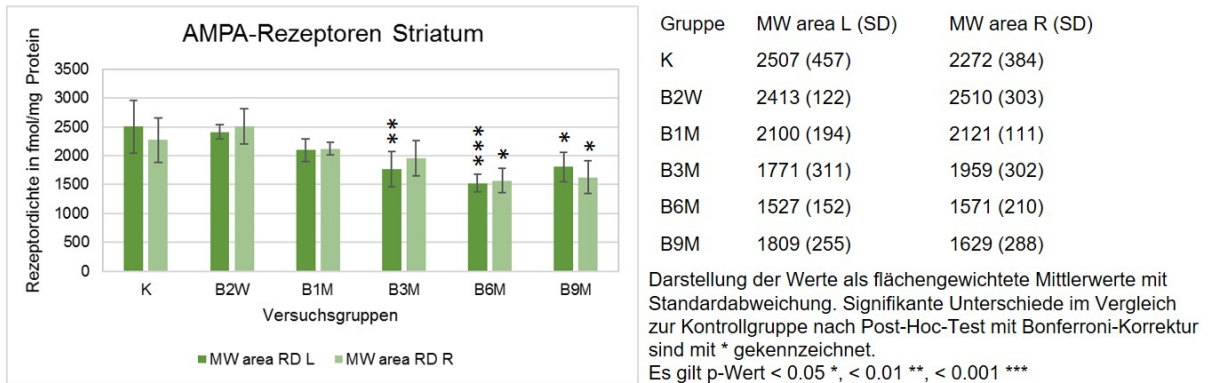


Abbildung 22: AMPA-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Tiere

Unter Vernachlässigung des interhemisphärischen Unterschiedes der Kontrollgruppe, kommt es zwei Wochen nach BoNT/A-Injektion zu keiner Veränderung der Rezeptordichte. Einen Monat nach Injektion stellt sich ebenfalls kein BoNT/A-Effekt dar. Gruppe B3M, B6M und B9M zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine beidseits reduzierte Rezeptordichte. Dabei ist der Unterschied mit Ausnahme des rechten Striatums der Gruppe B3M als signifikant erwiesen (B3M links $p = .008$; B6M links $p = .000$, rechts $p = .028$; B9M links $p = .010$, rechts $p = .041$). Kleine Unterschiede zwischen linker und rechter Seite in Gruppe B3M und B9M sind bei Extremwerten einzelner Tiere (vgl. Abbildung 20) als nicht relevant zu werten.

Die Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten zeigt Abbildung 23. Die einzelnen Untergruppen sind im Vergleich zu Gruppe L aufgetragen.

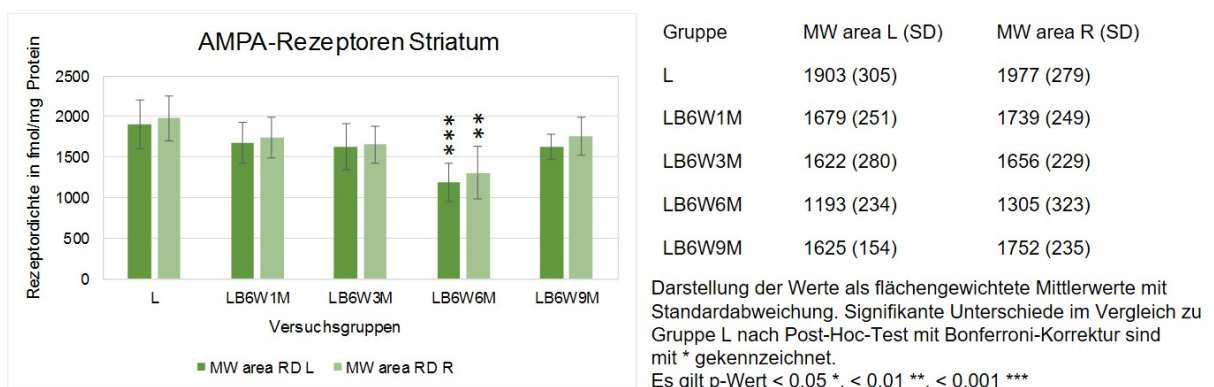


Abbildung 23: AMPA-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten

Im Vergleich zu Gruppe L zeigt Gruppe LB6W1M eine reduzierte Rezeptordichte in beiden Hemisphären. Die Rezeptordichte der Gruppe LB6W3M stellt sich auf demselben Niveau dar. Auch Gruppe LB6W6M weist im Vergleich zu Gruppe L beidseits kleinere Werte auf (links $p = .000$, rechts $p = .001$).

Neun Monate nach BoNT/A-Injektion zeigen sich im Vergleich zu Gruppe L ebenfalls niedrigere Werte. In allen Gruppen scheint die Dichte ipsilateral zur Läsion minimal größer.

Die in Abbildung 24 dargestellten Graphen zeigen die mittlere Rezeptordichte des linken und rechten Striatums im Verlauf der einzelnen Schnittebenen.

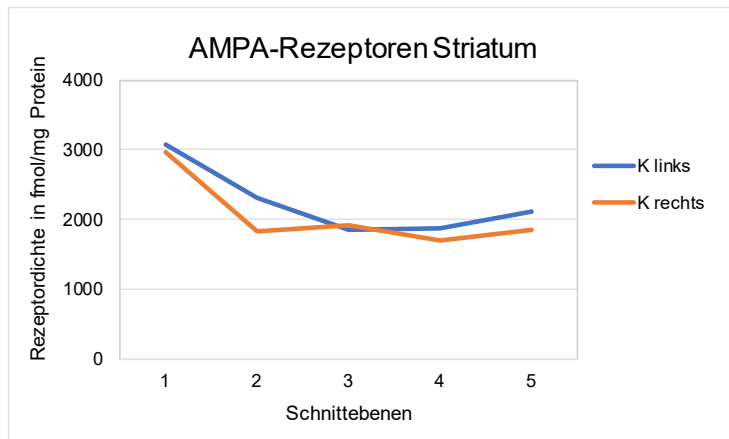
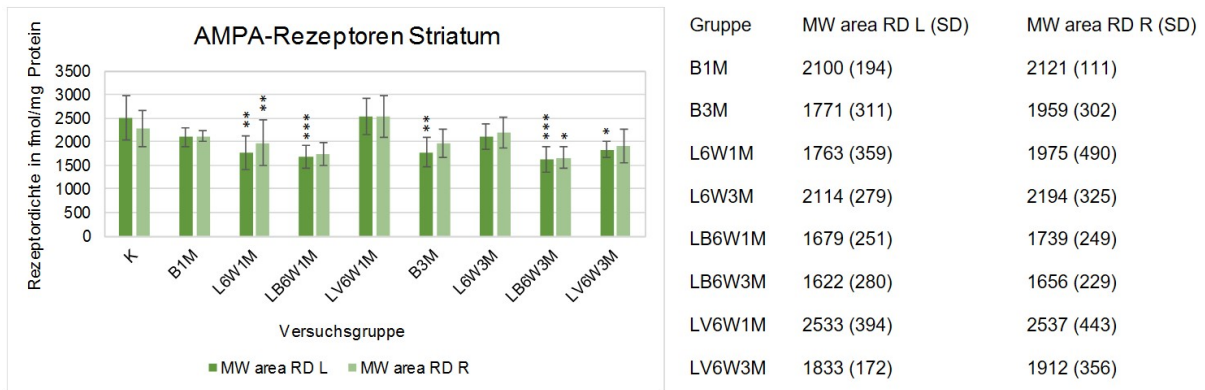


Abbildung 24: AMPA-Rezeptordichten der einzelnen Schnittebenen des Striatums

Dabei sei die Kontrollgruppe stellvertretend für die restlichen Versuchsgruppen dargestellt. In den Dichtekurven der einzelnen Versuchsgruppen zeigen sich, abgesehen von oben beschriebenen Veränderungen der Rezeptordichte, keine zusätzlichen Veränderungen zwischen den Schnittebenen oder beim Vergleich der Kurven des linken und rechten Striatums (nicht abgebildet). Es ergibt sich somit kein Hinweis auf eine isolierte Auswirkung von 6-OHDA-Läsion oder BoNT/A-Therapie auf einzelne Anteile des Striatums im rostro-kaudalen Verlauf. Die höchsten Rezeptordichten der AMPA-Rezeptoren finden sich bei allen Gruppen in Schnittebene eins. Schnittebene zwei weist, im Vergleich zu eins, beidseits deutlich niedrigere Werte auf. Nach kaudal verändert sich die Rezeptordichte nur noch minimal.

Zum direkten Vergleich sind in Abbildung 25 zwei entsprechende Altersklasse der einzelnen Versuchsgruppen gegeneinander aufgetragen.



Darstellung der Werte als flächengewichtete Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Post-Hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur sind mit * gekennzeichnet. Es gilt p-Wert < 0.05 *, < 0.01 **, < 0.001 ***

Abbildung 25: Vergleich der AMPA-Rezeptordichten einzelner Versuchsgruppen

In Gruppe LV6W1M verändert sich die Rezeptordichte unter Vernachlässigung des interhemisphärischen Unterschieds der Kontrollgruppe im Vergleich beidseits nicht. Gruppe LV6W3M zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe eine reduzierte Rezeptordichte beidseits, für links ist der Unterschied signifikant ($p = .037$). Der leichte Seitenunterschied in Gruppe L6W1M stellt sich weder in LV6W1M noch in Gruppe LB6W1M dar. Die Gruppen L6W3M und LV6W3M unterscheiden sich nicht signifikant. Der in Gruppe B3M angedeutete Seitenunterschied stellt sich in Gruppe LB6W3M im Vergleich zu L6W3M nicht dar. Weder Gruppe L6W3M noch LB6W3M unterscheiden sich signifikant von LV6W3M.

3.3 Kainat-Rezeptoren

In Abbildung 26 sind die mittleren flächengewichteten Rezeptordichten der vier Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt.

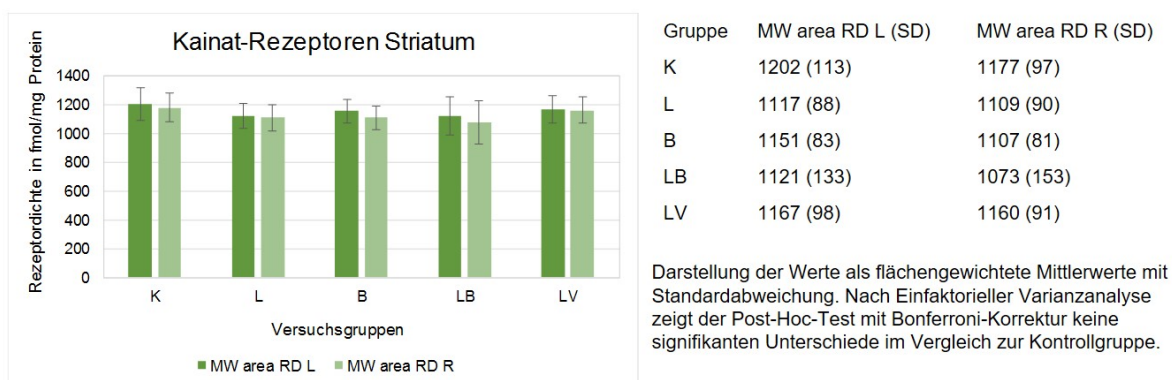


Abbildung 26: Kainat-Rezeptordichten der vier Versuchsgruppen

Die Kainat-Rezeptordichte der Kontrollgruppe liegt im linken Striatum bei durchschnittlich 1202 fmol/mg Protein und im rechten Striatum bei 1177 fmol/mg Protein. Es zeigen sich keine relevanten Unterschieden zwischen den Gruppen ($F(9,244)=1,327$ $p= .223$). Die deskriptive Statistik zeigt in Gruppe B und LB jeweils minimale Seitenunterschiede zwischen dem rechten und linken Striatum.

Abbildung 27 zeigt die relativen Rezeptordichten des Kainat-Rezeptors für die einzelnen Tiere der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

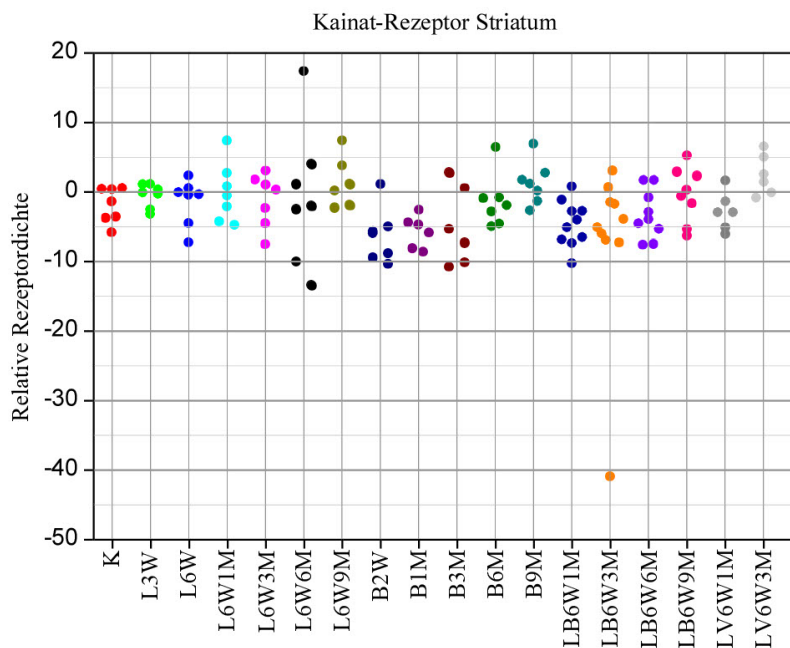


Abbildung 27: Relative Kainat-Rezeptordichten der einzelnen Versuchstiere

Gruppenübergreifend zeigt sich ein homogenes Bild, die Werte der einzelnen Tiere einer Gruppe sind mit Ausnahme von Gruppe L6W6M nicht weit gestreut. Dem Extremwert von +17 % in Gruppe L6W6M liegen Hirnschnitte mit reduzierter Qualität zu Grunde. Die relative Rezeptordichte von 6-OHDA-läsionierten Tieren liegt dabei überwiegend im Bereich des Nullpunktes. Es zeigt sich keine Seitenpräferenz. BoNT/A-Therapie führt in den Gruppen B2W ($\bar{x} = -6 \%$), B1M ($\bar{x} = -6 \%$) und auch in Gruppe B3M ($\bar{x} = -5 \%$) zu einer linksbetonten Rezeptordichte. In Gruppe B6M und B9M ist dieser Unterschied nicht vorhanden. In den 6-OHDA-läsionierten und BoNT/A-therapierten Gruppen spiegeln die durchschnittlich negativen Werte von Tieren der Gruppen LB6W1M ($\bar{x} = -5 \%$), LB6W3M ($\bar{x} = -7 \%$) und geringer auch LB6W6M ($\bar{x} = -4 \%$) eine größere Rezeptordichte des linken Striatums wider. Dabei ist der Wert von -41 % in Gruppe LB6W3M zu vernachlässigen. Bei Bildkontrolle zeigt sich ein „Drift“ innerhalb der rechten Hemisphäre (vgl. Abbildung 15).

In Gruppe LB6W9M ist kein Seitenunterschied vorhanden. Die Rezeptordichte in Gruppe LV6W1M und Gruppe LV6W3M weist ebenfalls keinen Seitenunterschied auf.

In Abbildung 28 sind die mittleren Rezeptordichten von Gruppen der Hemiparkinsonratten mit unterschiedlicher Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt.

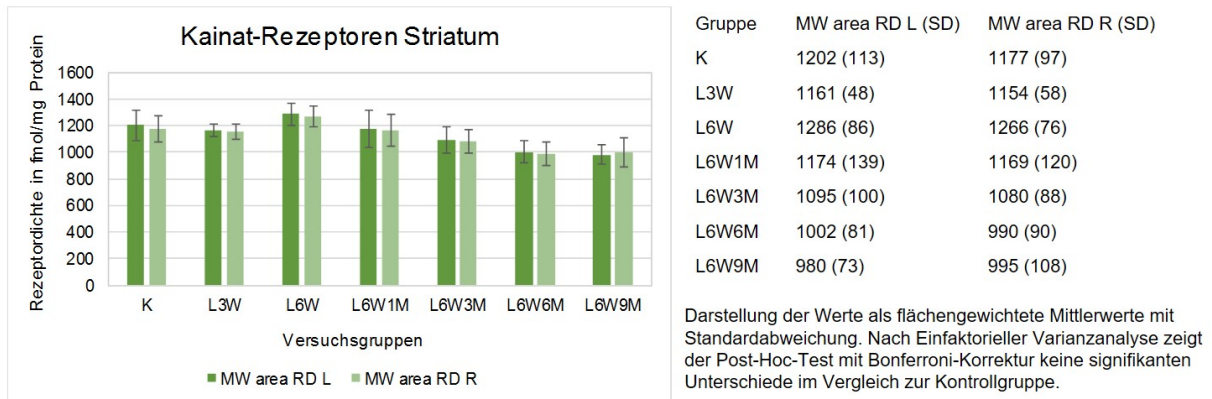


Abbildung 28: Kainat-Rezeptordichten der 6-OHDA-läsionierten Tiere

Drei Wochen nach 6-OHDA-Läsion kommt es zu keiner Veränderung der Rezeptordichte. Gruppe L6W und L6W1M unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Es zeigen sich keine Seitenunterschiede zwischen den beiden Hemisphären. Über die Gruppen hinweg nimmt die Rezeptordichte im Vergleich zur Kontrollgruppe gleichmäßig auf beiden Seiten ab. Die Rezeptordichte der Gruppe L6W9M ist im Vergleich zur Gruppe L3W beidseits kleiner (links $p = .001$, rechts $p = .011$).

In Abbildung 29 ist die mittlere Rezeptordichte der BoNT/A-therapierten Versuchsguppen im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgetragen.

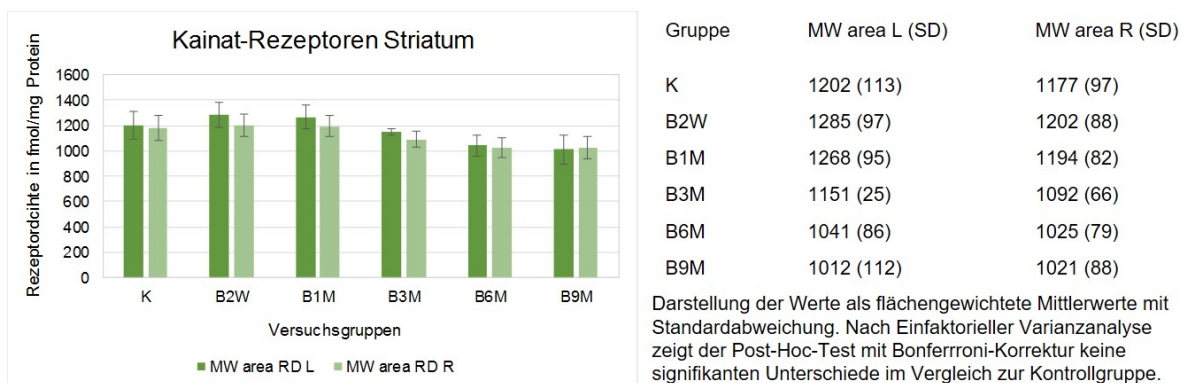


Abbildung 29: Kainat-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Tiere

BoNT/A-Injektion in das rechte Striatum führt zu keinen signifikanten Veränderungen der mittleren Rezeptordichte. In der deskriptiven Statistik stellen sich in den Gruppen B2W, B1M und minimal auch in B3M, im Vergleich zu links kleinere Werte des rechten Striatums dar. Im Verlauf der Gruppen kommt es zu einer Reduktion der Rezeptordichte beidseits. Dabei verringert sich die Seitendifferenz, in Gruppe B9M ist kein Unterschied mehr darstellbar. Der Vergleich der mittleren Rezeptordichte der Gruppe B2W mit B6M und B9M führt für das linke Striatum zu signifikant kleineren Werten (B6M $p = .033$, B9M $p = .004$).

In Abbildung 30 sind die mittleren Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten im Vergleich zu Gruppe L dargestellt.

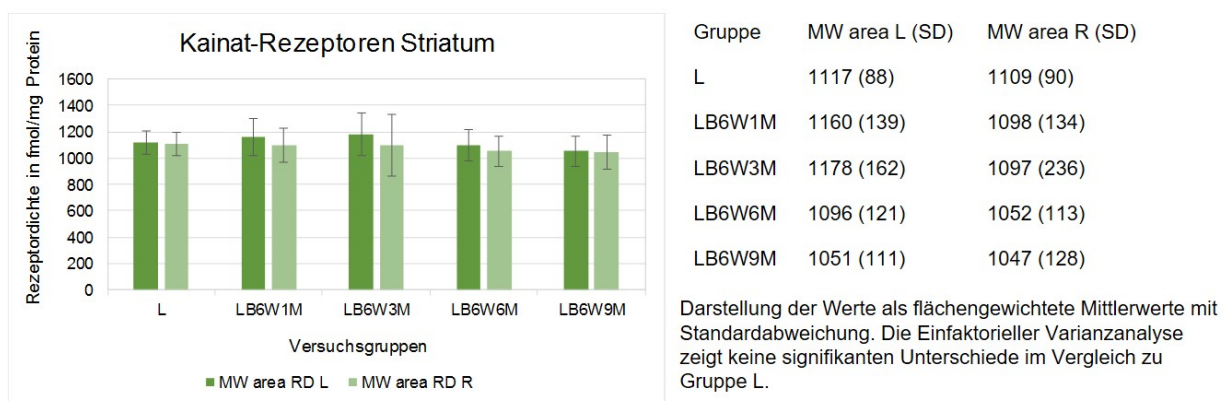


Abbildung 30: Kainat-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten

Der für die Gruppe der BoNT/A-therapierten Tiere beschriebene Seitenunterschied, zeigt sich auch in dieser Versuchsgruppe. Die Gruppen LB6W1M, LB6W3M und LB6W6M weisen im Seitenvergleich kleinere Rezeptordichten des rechten Striatums auf. In Gruppe LB6W9M stellt sich der interhemisphärielle Unterschied nicht mehr dar. Zudem kommt es im Verlauf der Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe beidseits zu einem leichten Abfall der Rezeptordichte (nicht gezeigt). Dabei ist keine der beschriebenen Veränderungen signifikant.

Abbildung 31 zeigt die Verteilung der Kainat-Rezeptordichte in den einzelnen Schnittebenen des linken und rechten Striatums. Exemplarisch sind die mittleren Werte der Kontrollgruppe dargestellt.

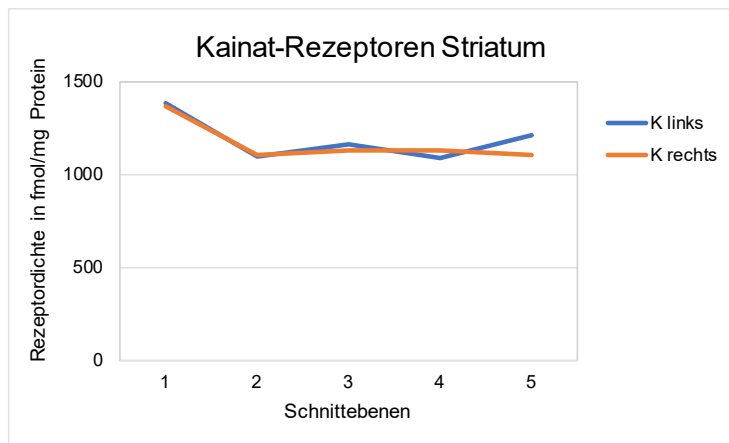
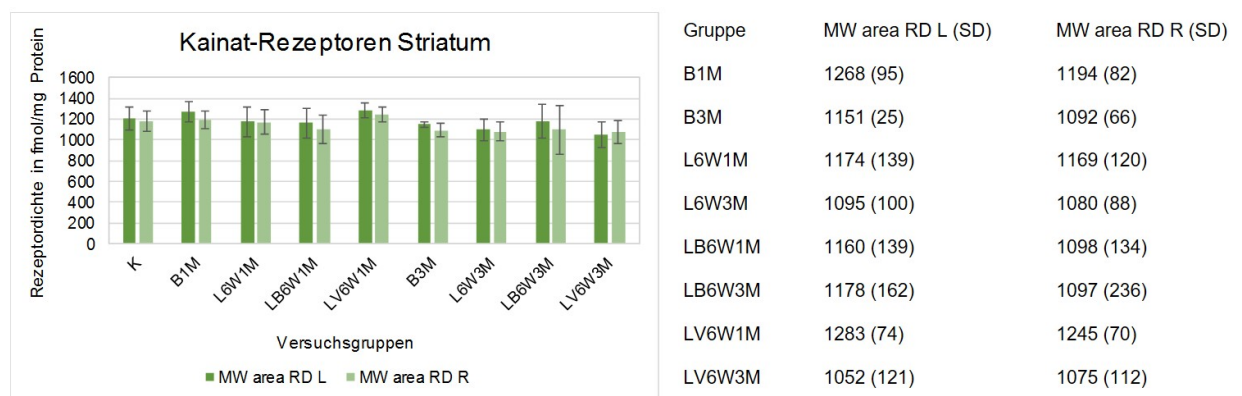


Abbildung 31: Kainat-Rezeptordichten der einzelnen Schnittebenen des Striatums

Bei der Beurteilung der Kainat-Dichtekurven fällt in allen Gruppen auf, dass die Graphen des rechten Striatums homogener sind als links, dort stellen sich deutlich mehr Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Schnittebenen dar (nicht gezeigt). Außer den oben beschriebenen Seitenunterschieden in den Gruppen B und LB, zeigen sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Hemisphären. Die Kainat-Rezeptordichte ist in allen Gruppen beidseits in Schnittebene eins am größten und fällt zu Schnittebene zwei deutlich ab. Ausgehend von Schnittebene zwei stellt sich beidseits ein relatives Plateau ein, das geringen Schwankungen unterliegt.

Abbildung 32 dient dem direkten Vergleich der vier Versuchsgruppen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Es sind ebenfalls mittlere flächengewichtete Rezeptordichten dargestellt.



Darstellung der Werte als flächengewichtete Mittelwerte mit Standardabweichung. Nach Einfaktorieller Varianzanalyse zeigt der Post-Hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Abbildung 32: Vergleich der Kainat-Rezeptordichten einzelner Versuchsgruppen

Es lassen sich minimale Unterschiede erkennen, die jedoch nicht signifikant sind. Die Gruppen L6W1M und LV6W1M unterscheiden sich nicht relevant. Im Vergleich zu Gruppe LV6W1M stellt sich in Gruppe LB6W1M ein größerer Seitenunterschied dar.

Es zeigt sich eine Reduktion der Rezeptordichte des rechten Striatums im Vergleich zu links. Gruppe L6W1M weist im Gegensatz dazu keinen Seitenunterschied auf. Drei Monate nach 6-OHDA-Läsion kommt es in Gruppe L6W3M und auch Gruppe LV6W3M im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner relevanten Veränderung der Rezeptordichte. Im Vergleich dazu stellt sich in Gruppe LB6W3M ein kleiner Seitenunterschied dar.

3.4 NMDA-Rezeptoren

In Abbildung 33 sind die mittleren Rezeptordichten der vier großen Versuchsgruppen im direkten Vergleich untereinander und zur Kontrollgruppe dargestellt.

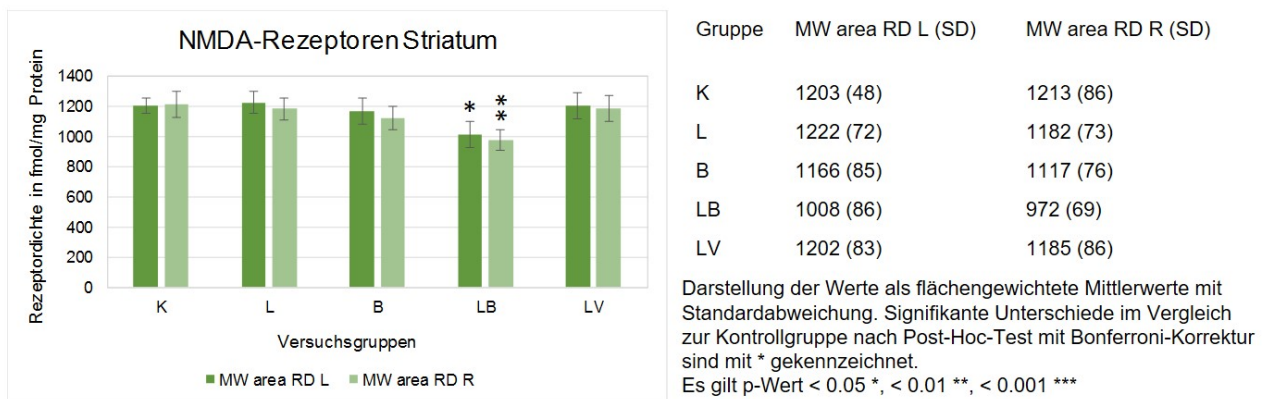


Abbildung 33: NMDA-Rezeptordichten der vier Versuchsgruppen

Für die Kontrollgruppe ergibt sich ein Wert von 1203 fmol/mg Protein für das linke und 1213 fmol/mg Protein für das rechte Striatum. Eine 6-OHDA-Läsion führt zu keiner Veränderung der Rezeptordichte. Anschließende Scheintherapie wirkt sich ebenfalls nicht auf die Rezeptordichte von NMDA-Rezeptoren aus. Auch die Gruppe der BoNT/A-therapierten Tiere zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied der Rezeptordichte. Die Gruppe der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe eine reduzierte Rezeptordichte beidseits (links -16.2 %, $p = .014$, rechts -19.8 %, $p = .000$). Dabei weist keine der Gruppen einen relevanten Seitenunterschied auf.

Die relativen Rezeptordichten der einzelnen Tiere sind in Abbildung 34 dargestellt.

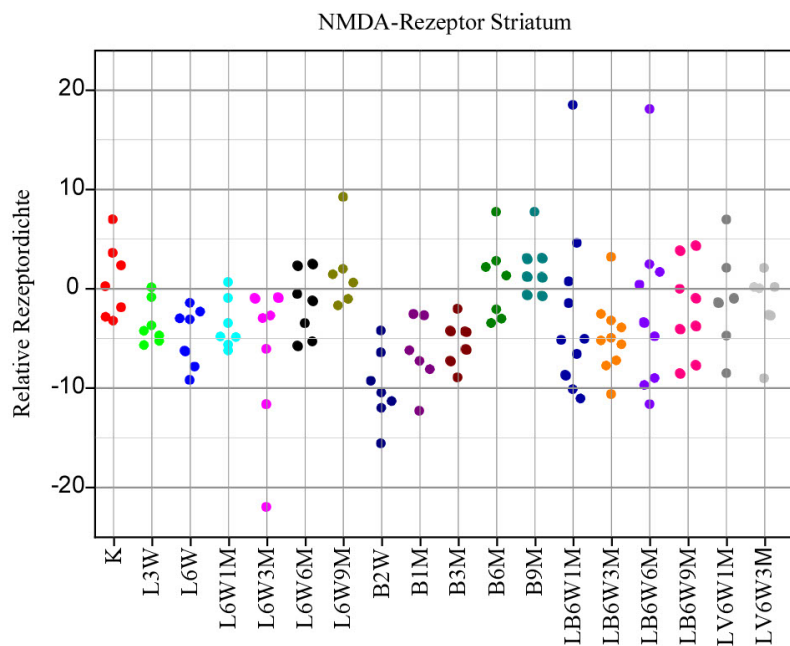


Abbildung 34: Relative NMDA-Rezeptordichten der einzelnen Versuchstiere

Die Werte der Kontrollgruppe sind im Bereich zwischen -5 und +8 % gestreut. Es zeigt sich keine Seitenpräferenz. Die Gruppen der 6-OHDA-läsionierten Tiere weisen eine mäßige Streuung der Einzelwerte auf. Auffällig ist ein einzelner Wert von -22 % in Gruppe L6W3M. Bei Bildkontrolle zeigt sich eine reduzierte Abbildungsqualität der linken Hemisphäre, was die großen Seitenunterschiede der Rezeptordichte erklären könnte. Außer in Gruppe L6W9M liegen die Werte überwiegend im negativen Bereich. Im Durchschnitt zeigt sich jedoch keine eindeutige Seitenpräferenz. BoNT/A-Therapie führt in Gruppe B2W ($\bar{x} = -10\%$), B1M ($\bar{x} = -7\%$) und B3M ($\bar{x} = -6\%$) durchschnittlich zu einem Überwiegen der Rezeptordichte des linken Striatums. Der Unterschied nimmt über die Zeit ab, die Gruppen B6M und B9M weisen keinen Seitenunterschied mehr auf. In den 6-OHDA-läsionierten Gruppen mit anschließender BoNT/A-Therapie, zeigt sich unter Vernachlässigung der beiden Extremwerte von +18 % in Gruppe LB6W1M und in Gruppe LB6W6M, eine linksbetonte Rezeptordichte. Die Einzelwerte sind dabei mäßig gestreut. Eine erneute Bildkontrolle liefert keine ursächliche Erklärung für die beschriebenen Extremwerte. Die Gruppen der scheinbehandelten Tiere zeigen keine Seitenpräferenz.

Abbildung 35 zeigt die mittlere Rezeptordichte der einzelnen 6-OHDA-läsionierten Tiergruppen mit unterschiedlicher Überlebensdauer.

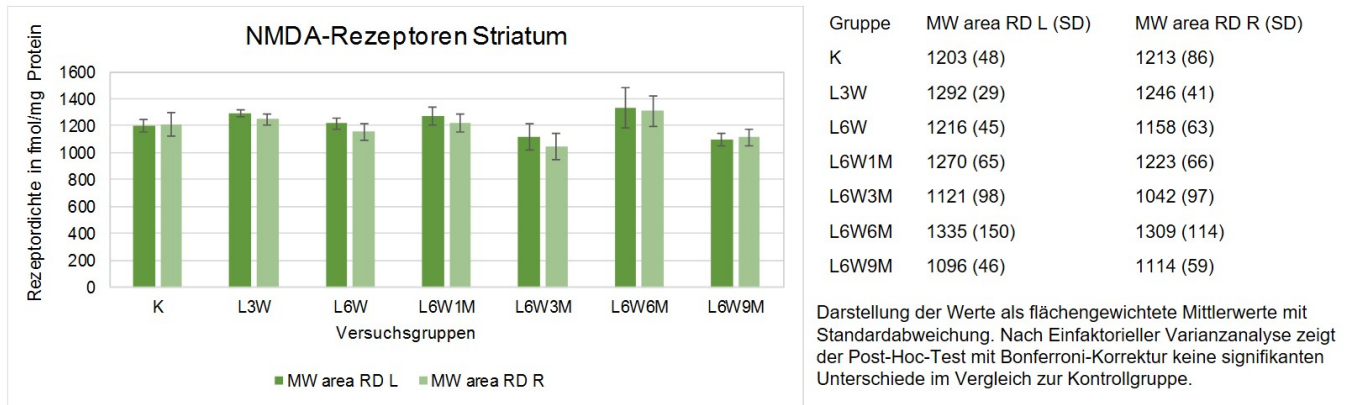


Abbildung 35: NMDA-Rezeptordichten der 6-OHDA-läsionierten Tiere

6-OHDA-Läsion führt zu keiner relevanten Veränderung der mittleren Rezeptordichte. Die Werte der Gruppen K, L3W, L6W und L6W1M zeigen nur minimale Unterschiede. Die Gruppen L6W3M und L6W9M präsentieren sich im Vergleich zur Kontrollgruppe beidseits mit einer kleineren Rezeptordichte. Die Werte der Gruppe L6W6M hingegen, erscheinen im Vergleich zur Kontrollgruppe beidseits größer. Keiner der beschriebenen Unterschiede ist statistisch signifikant. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, zeigen die Gruppen der 6-OHDA-läsionierten Tiere einen irrelevanten Seitenunterschied, mit kleineren Rezeptordichten des rechten Striatums. Der deutlichere Seitenunterschied in Gruppe L6W3M ist auf einen Extremwert zurückzuführen (vgl. Abbildung 34).

In Abbildung 36 ist die Auswirkung einer BoNT/A-Injektion in das rechte Striatum auf die mittlere Rezeptordichte von NMDA-Rezeptoren dargestellt.

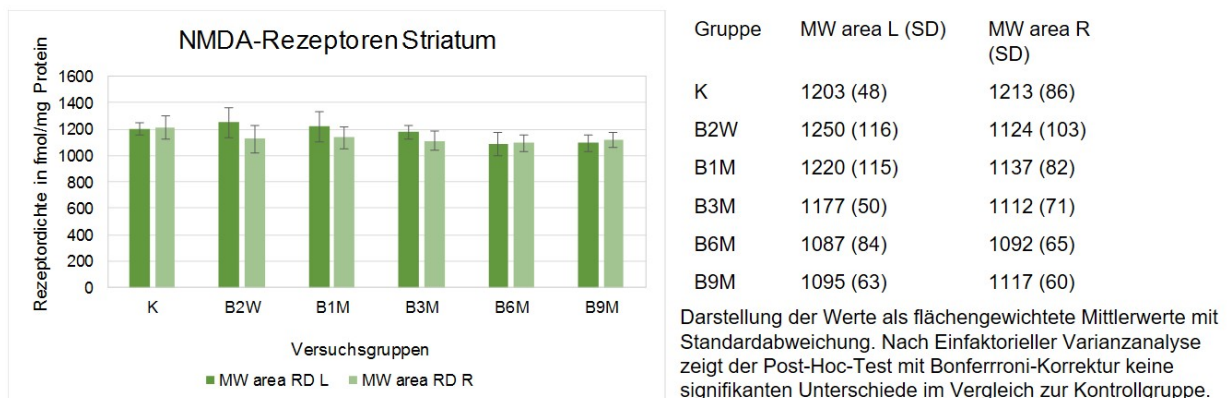


Abbildung 36: NMDA-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Tiere

Im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt es in den Gruppen B2W, B1M und B3M ipsilateral der Läsion zu einer Reduktion der Rezeptordichte des Striatums um ca. 7 %, 6 % und 8 %. Die Rezeptordichte der kontralateralen Seite zeigt keine Veränderung. So stellt sich in den genannten Gruppen ein interhemisphärischer Unterschied dar.

Gruppe B6M und B9M weisen keine Seitenunterschiede auf, die Rezeptordichte ist in beiden Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe beidseits leicht reduziert. Keiner der beschriebenen Unterschiede ist statistisch signifikant.

Abbildung 37 zeigt die mittlere Rezeptordichte von 6-OHDA-läsionierten Tieren mit BoNT/A-Therapie.

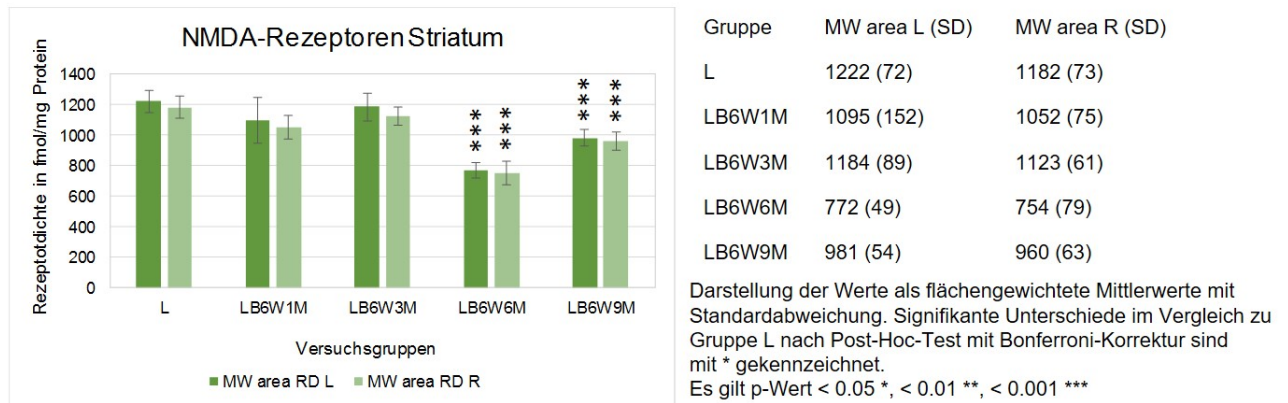


Abbildung 37: NMDA-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten

Gruppe LB6W1M zeigt im Vergleich zu Gruppe L einen beidseitigen Abfall der Rezeptordichte. Die Gruppe LB6W3M unterscheidet sich nicht relevant von Gruppe L. Ein deutlicher Abfall stellt sich im Vergleich zu L beidseits in Gruppe LB6W6M dar (links $p = .000$, rechts $p = .000$). Die Gruppe LB6W9M weist im Vergleich zu Gruppe L ebenfalls kleinere Werte auf (links $p = .000$, rechts $p = .000$). Es zeigen sich kleine Seitenunterschiede in den Gruppen LB6W1M und LB6W3M, die Rezeptordichte des rechten Striatums ist hier minimal kleiner als links. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht relevant zwischen den beiden Hemisphären.

Die in Abbildung 38 dargestellten Graphen beschreiben die mittlere Rezeptordichte von NMDA-Rezeptoren des linken und rechten Striatums, im Verlauf der einzelnen Schnittebenen. Die Werte der Kontrollgruppe sind exemplarisch dargestellt.

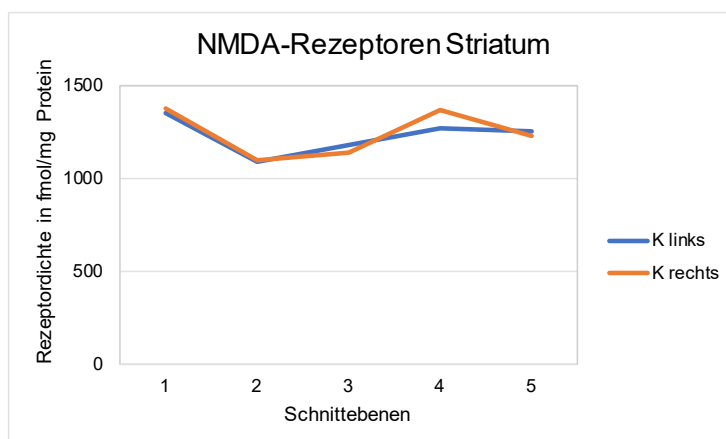
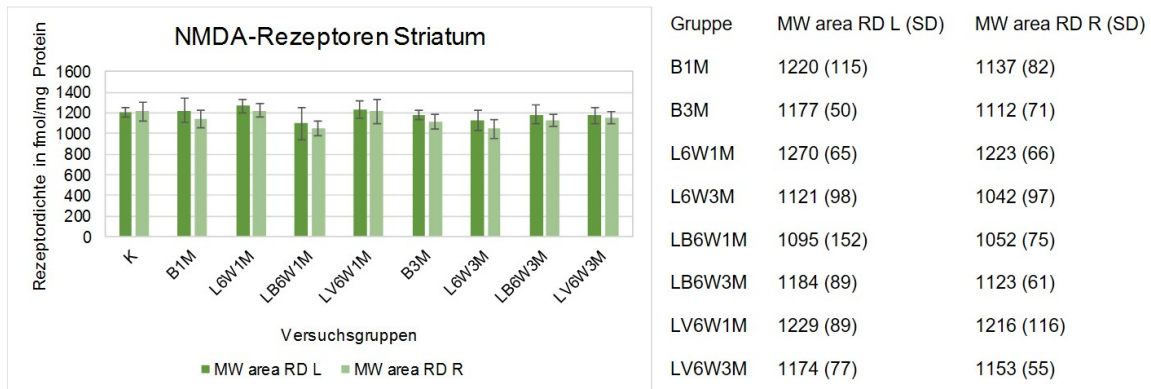


Abbildung 38: NMDA-Rezeptordichten der einzelnen Schnittebenen des Striatums

Bis auf die in den Säulendiagrammen beschriebenen leichten Seitenunterschiede in Gruppe B und LB, sind die Graphen der rechten und linken Seite in allen Gruppen nahezu deckungsgleich (nicht gezeigt). Die Rezeptordichte fällt dabei in allen Gruppen von Schnittebene eins zu zwei ab, um dann nach Schnittebene drei wieder anzusteigen. Die höchsten Rezeptordichten finden sich so in den rostralen und kaudalen Schnitten.

Abbildung 39 zeigt eine Zusammenfassung der Rezeptordichten einzelner Versuchsgruppen zu zwei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrollgruppe.



Darstellung der Werte als flächengewichtete Mittelwerte mit Standardabweichung. Nach Einfaktorieller Varianzanalyse zeigt der Post-Hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Abbildung 39: Vergleich der NMDA-Rezeptordichten einzelner Versuchsgruppen

Die Gruppen B, L und LB zeigen sowohl nach einem, als auch nach drei Monaten, im gegenseitigen Vergleich keine relevanten Unterschiede. Den vier Gruppen gemeinsam ist eine minimale Seitendifferenz zu Gunsten des linken Striatums, die sich zu entsprechendem Zeitpunkt in den scheintherapierten Gruppen nicht darstellt.

3.5 mGlu2/3-Rezeptoren

Einen Überblick über die mittleren Rezeptordichten der vier großen Versuchsgruppen von mGlu2/3-Rezeptoren zeigt Abbildung 40.

Für die Rezeptordichte der mGlu2/3-Rezeptoren im Striatum ergibt sich in der Kontrollgruppe ein mittlerer Wert von 3461 fmol/mg Protein für das linke und 3482 fmol/mg Protein für das rechte Striatum. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt sich in allen Gruppen eine beidseitige Abnahme der Rezeptordichte. Dabei reduzieren sich in der Gruppe von 6-OHDA-läsionierten Tieren die Werte um links 12 %, und rechts 11 %.

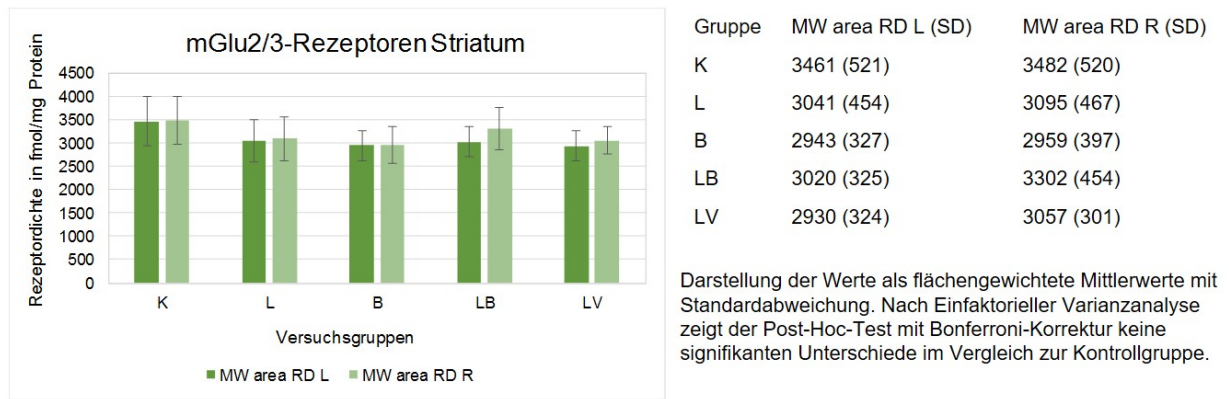


Abbildung 40: mGlu2/3-Rezeptordichten der vier Versuchsgruppen

Die Rezeptordichten der Gruppen B, LB und LV liegen im Bereich der Werte der Gruppe L. Keine der genannten Veränderungen zeigt sich statistisch signifikant. In der Gruppe der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonstiere, zeigt sich ein Unterschied zwischen den Hemisphären. Die Rezeptordichte des rechten Striatums ist größer als links.

Abbildung 41 stellt die relativen Rezeptordichten der einzelnen Versuchstiere dar.

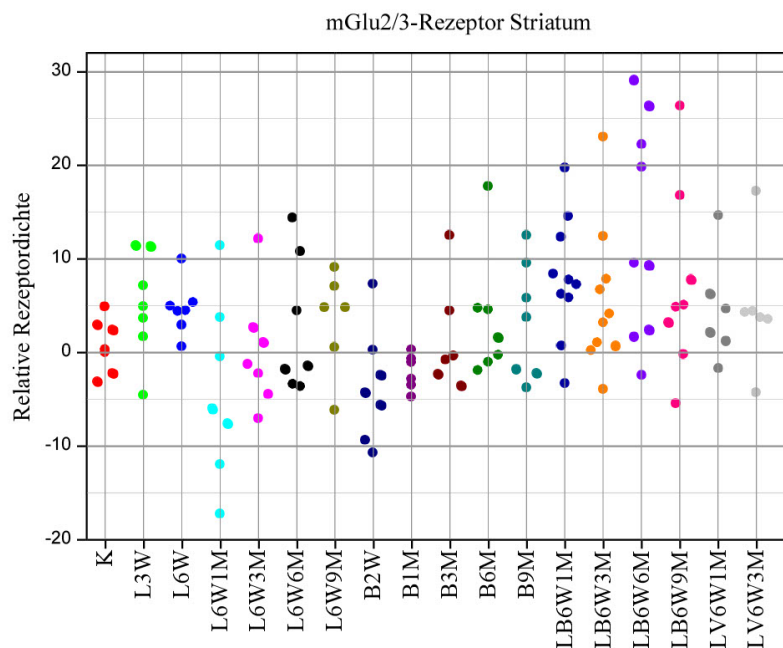


Abbildung 41: Relative mGlu2/3-Rezeptordichten der einzelnen Versuchstiere

Die Kontrollgruppe weist eine geringe Streuung auf. Es zeigt sich im Mittel kein Seitenunterschied. Bei den läsionierten Tieren liegen die Werte der Gruppen L3W, L6W und L6W9M bei mäßiger Streubreite überwiegend im positiven Bereich. Im Mittel stellt sich in diesen Gruppen eine leicht rechtsbetonte Rezeptordichte ohne Relevanz dar. Große Streubreite, ohne eindeutige Seitendominanz, sieht man in Gruppe L6W1M. Die Gruppen L6W3M und L6W6M zeigen keine Seitendominanz.

BoNT/A-Therapie führt zu keinem eindeutigen interhemisphäriellen Unterschied. Bis auf Gruppe B2W und B9M zeigt sich ein homogenes Bild, mit geringer Streubreite. Für die Extremwerte von 13 % in Gruppe B3M und 18 % in Gruppe B6M konnte bei erneuter Bildkontrolle keine Ursache gefunden werden. Die Werte der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten liegen überwiegend im positiven Bereich. Im Mittel zeigen sich Werte von +9 % (LB6W1M), +7% (LB6W3M), +15 % (LB6W6M) und +7 % (LB6W9M). Dabei sind die Werte mittelmäßig gestreut. Für die große Spanne der Einzelwerte in Gruppe LB6W6M, ließ sich bei Bildkontrolle kein Korrelat nachweisen. Die Werte der scheinbehandelten Tiere sind ebenfalls überwiegend positiv, es zeigt sich im Mittel aber keine relevante Seitendominanz.

In Abbildung 42 sind die mittleren Rezeptordichten der einzelnen 6-OHDA-läsionierten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgetragen.

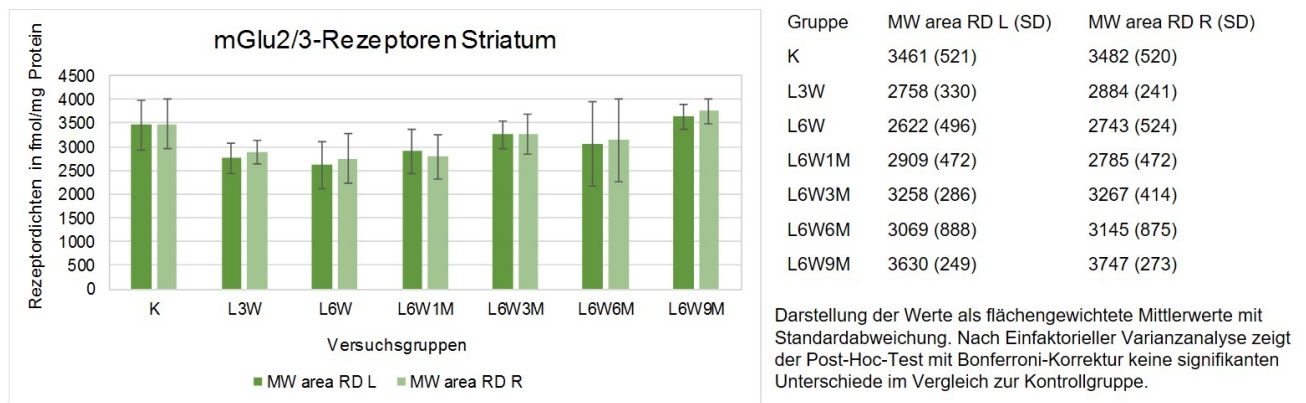
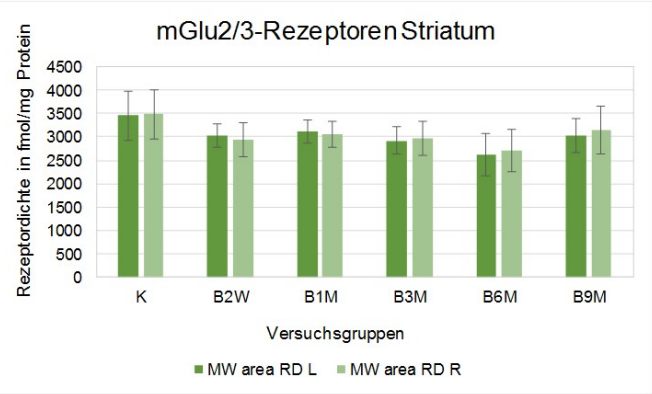


Abbildung 42: mGlu2/3-Rezeptordichten der 6-OHDA-läsionierten Tiere

Drei Wochen nach 6-OHDA-Läsion zeigt sich die Rezeptordichte im Vergleich zur Kontrollgruppe beidseits reduziert, um rechts 18 % und links 20 %. Auch bei den älteren Tieren in Gruppe L6W und L6W1M kommt es zum beidseitigen Abfall der Werte, ähnlich der Gruppe L3W. Gruppe L6W3M weist im Vergleich zu L6W1M beidseits eine größere Rezeptordichte auf. Ein weiterer Anstieg der Werte zeigt sich in Gruppe L6W9M. Innerhalb der Gruppen fallen keine relevanten Seitenunterschiede auf. Die beschriebenen Veränderungen zeigen sich nicht signifikant.

Abbildung 43 stellt die mittlere Rezeptordichte der einzelnen BoNT/A-therapierten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe dar.



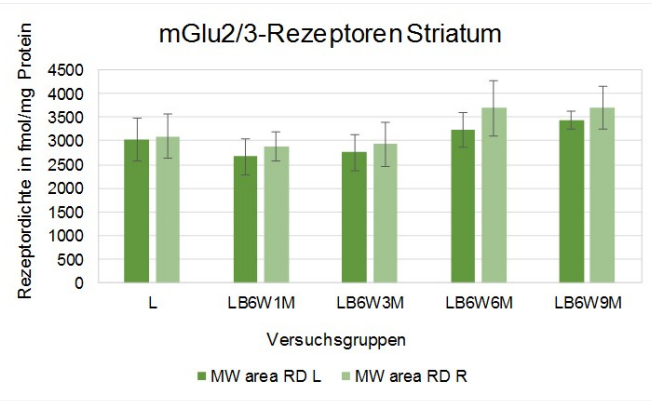
Gruppe	MW area L (SD)	MW area R (SD)
K	3461 (521)	3482 (520)
B2W	3036 (251)	2931 (368)
B1M	3110 (249)	3045 (278)
B3M	2924 (304)	2973 (373)
B6M	2612 (460)	2699 (452)
B9M	3032 (369)	3144 (511)

Darstellung der Werte als flächengewichtete Mittelwerte mit Standardabweichung. Nach Einfaktorieller Varianzanalyse zeigt der Post-Hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Abbildung 43: mGlu2/3-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Tiere

Ebenso wie bei den 6-OHDA-läsionierten, zeigt sich auch in den BoNT/A-therapierten Gruppen ein beidseitiger Abfall der Rezeptordichte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei unterscheiden sich die Werte der Gruppen unterschiedlich alter Tieren nicht relevant. Innerhalb der Gruppen zeigen sich keine Seitenunterschiede zwischen dem rechten und linken Striatum.

Abbildung 44 stellt die mittlere Rezeptordichte der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten dar.



Gruppe	MW area L (SD)	MW area R (SD)
L	3041 (454)	3095 (467)
LB6W1M	2668 (372)	2887 (314)
LB6W3M	2752 (368)	2936 (466)
LB6W6M	3222 (369)	3691 (582)
LB6W9M	3438 (190)	3692 (453)

Darstellung der Werte als flächengewichtete Mittelwerte mit Standardabweichung. Nach Einfaktorieller Varianzanalyse zeigt der Post-Hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Gruppe L.

Abbildung 44: mGlu2/3-Rezeptordichten der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten

Im Vergleich zu Gruppe L zeigt sich in allen Gruppen ein interhemisphärieller Unterschied. Die Rezeptordichte des rechten Striatums stellt sich größer als links dar. Die Gruppen LB6W6M und LB6W9M weisen im Vergleich zu L beidseits größere Rezeptordichten auf. Keine der beschriebenen Veränderungen zeigt sich statistisch signifikant.

Abbildung 45 zeigt die mittlere Rezeptordichte der mGlu2/3-Rezeptoren, verteilt auf die einzelnen Schnittebenen des linken und rechten Striatums.

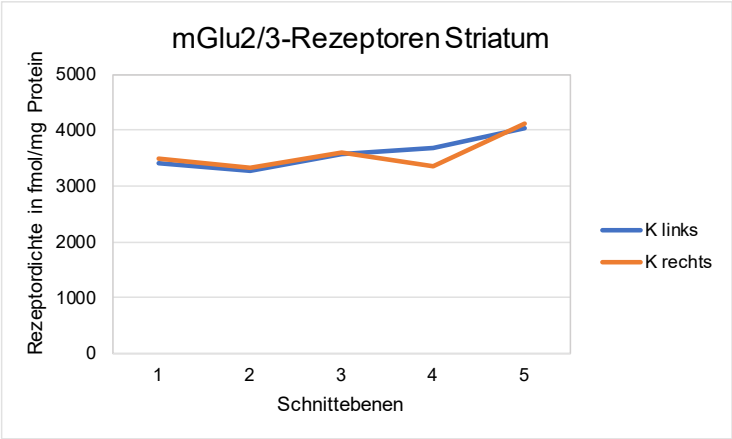
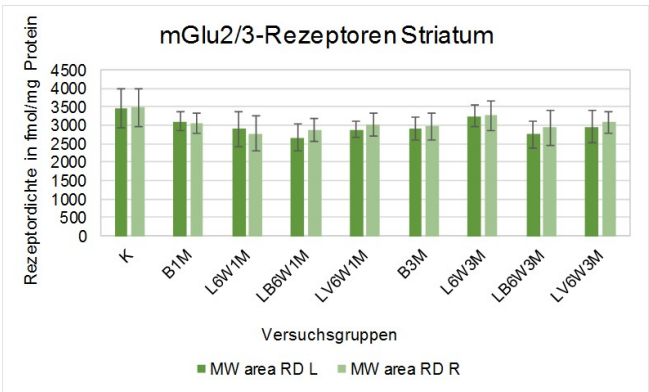


Abbildung 45: mGlu2/3-Rezeptordichten der einzelnen Schnittebenen des Striatums

In keiner Gruppe stellt sich ein isolierter Einfluss der Therapie auf einzelne Schnittebenen dar (nicht gezeigt). Somit ist die Kontrollgruppe stellvertretend für die restlichen Gruppen abgebildet. Im Gegensatz zu den anderen Glutamatrezeptoren, unterscheiden sich die Rezeptordichten der Schnittebene eins bis vier nur geringfügig. Die größten Rezeptordichten für mGlu2/3-Rezeptoren liegen tendenziell in den hinteren Schnittebenen.

Abbildung 46 zeigt einen Vergleich der vier Gruppen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten.



Gruppe	MW area RD L (SD)	MW area RD R (SD)
B1M	3110 (249)	3045 (278)
B3M	2924 (304)	2973 (373)
L6W1M	2909 (472)	2785 (472)
L6W3M	3258 (286)	3267 (414)
LB6W1M	2668 (372)	2887 (314)
LB6W3M	2752 (368)	2936 (466)
LV6W1M	2892 (207)	3026 (311)
LV6W3M	2968 (440)	3088 (291)

Darstellung der Werte als flächengewichtete Mittelwerte mit Standardabweichung. Nach Einfaktorieller Varianzanalyse zeigt der Post-Hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Abbildung 46: Vergleich der mGlu2/3-Rezeptordichten einzelner Versuchsgruppen

Die Rezeptordichten der dargestellten Gruppen weisen im Vergleich zur Kontrollgruppe beidseits reduzierte Werte auf. Die Gruppen der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten, zeigen im Vergleich zu rein läsionierten Tieren einen interhemisphäriellen Unterschied, mit einer größeren Rezeptordichte ipsilateral zur Läsion. Dieser Unterschied stellt sich auch bei scheintherapierten Tieren leicht dar. Die Gruppen der rein BoNT/A-therapierten Tiere zeigen keinen relevanten Seitenunterschied.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die AMPA-Rezeptoren ergibt sich eine mittlere Rezeptordichte von 2390 fmol/mg Protein im unbehandelten Striatum der gesunden Ratte. Die Dichte an AMPA-Rezeptoren ist versuchsgruppenübergreifend in Schnittebene eins am größten. Von rostral nach kaudal nimmt sie ab. Der größte Unterschied zeigt sich dabei zwischen Schnittebene eins und zwei, ab Schnitteben drei bleibt die Rezeptordichte relativ konstant. Nach rechtsseitiger 6-OHDA-Läsion kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der Rezeptordichte. BoNT/A-Injektion wirkt sich nicht signifikant auf die Rezeptordichte von AMPA-Rezeptoren im Striatum aus.

Für die Kainat-Rezeptoren ergibt sich eine mittlere Rezeptordichte von 1189 fmol/mg Protein im unbehandelten Striatum der gesunden Ratte. Die größten Rezeptordichten finden sich in Schnittebene eins. In allen Versuchsgruppen deutet sich eine beidseitige Abnahme der Rezeptordichte über die Zeit an. 6-OHDA-Läsion führt zu keiner Veränderung der Rezeptordichte. BoNT/A-Therapie führt möglicherweise zu einer Seitendifferenz mit einer leicht reduzierten Rezeptordichte des rechten Striatums, die sich sowohl in den BoNT/A-therapierten (B) als auch in den BoNT/A-therapierten und läsierten Gruppen (LB) zeigt, allerdings statistisch nicht signifikant ist.

Für die NMDA-Rezeptoren ergibt sich eine mittlere Rezeptordichte von 1208 fmol/mg Protein im unbehandelten Striatum der gesunden Ratte. Die größten Rezeptordichten findet man in Schnittebene eins, sowie den dorsalen Schnittebenen vier und fünf. 6-OHDA-Läsion führt zu keiner Veränderung der mittleren Rezeptordichte. In den Gruppen der BoNT/A-therapierten Kontrolltiere, kommt es zu keiner deutlichen Veränderung. Jedoch zeigt sich eine leichte Tendenz zur Abnahme der Rezeptordichte im rechten Striatum innerhalb der ersten 3 Monaten nach Therapie. Passend dazu, stellen sich die relativen Rezeptordichten in den ersten 3 Monaten linksbetont dar. In den Gruppen der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten deutet sich diese Tendenz, ohne Korrelat in LV, ebenfalls an.

Für die mGlu2/3-Rezeptoren ergibt sich eine mittlere Rezeptordichte von 3472 fmol/mg Protein im unbehandelten Striatum der gesunden Ratte. Bis auf einen leichten Anstieg der Rezeptordichte in den kaudalen Schnitten, erscheinen die Rezeptoren zwischen den Schnittebenen eins und fünf gleichmäßig verteilt. 6-OHDA-Läsion führt zu keiner relevanten Veränderung der Rezeptordichte. BoNT/A-Therapie von Kontrolltieren bewirkt ebenfalls keine Veränderungen der Rezeptordichte. In den Gruppen der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten zeigt sich ein interhemisphärieller Unterschied, mit Anstieg der Rezeptordichte ipsilateral zur Läsion. Dieser bildet sich auch in der Darstellung der relativen Rezeptordichte ab.

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

Die quantitative Rezeptorautoradiographie ist eine weit verbreitete und vielfach eingesetzte Methode zur Darstellung der Verteilung von Rezeptoren im ZNS (Sovago et al. 2001). Trotz des jahrelangen Einsatzes gibt es Einschränkungen und Probleme, die bei der Interpretation von Ergebnissen beachtet werden müssen.

Bei der quantitativen Rezeptorautoradiographie handelt es sich um eine in-vitro-Messung. Das Bindungsverhalten der Liganden an ihre Rezeptoren wird nach dem Tod der Tiere sowie Aufarbeitung der Gehirne untersucht. Es ist somit möglich, dass es post-mortem durch Asphyxie, oder durch die Verarbeitung des Materials nach Entnahme, zu Veränderungen der Rezeptorstabilität kommt (Manuel et al. 2015; Sovago et al. 2001). Dabei scheint die Rezeptordichte nach Kryokonservierung relativ stabil zu sein (McKinney und Raddatz 2006). Deswegen wurde das Material in unserer Studie sofort nach Entnahme in Isopentan eingefroren und bei -80°C gelagert. Wichtig ist weiterhin, dass die Methode eine indirekte Messung der Rezeptordichte darstellt. Der Grauwert der Autoradiogramme wird, unter Verwendung von Eichstandards mit bekannter Radioaktivität, in eine Ligandenkonzentration übersetzt (Zilles et al. 1991b). Von der Radioaktivitätskonzentration im Gewebe wird auf eine Rezeptordichte geschlossen. Eine reduzierte Ligandenkonzentration interpretiert man somit als Reduktion der Dichte von Rezeptoren. Die Reduktion der Ligandenbindung kann jedoch auch durch einen Affinitätsverlust des Liganden zu seinem Rezeptor bedingt sein. Eine Veränderung der Rezeptor-Konformation, zum Beispiel durch Austausch von Untereinheiten, könnte somit ebenfalls Einfluss auf das Bindungsverhalten haben und eine veränderte Dichte von Rezeptoren vortäuschen (Ulas et al. 1994). Voraussetzung für die Methode ist eine hoch-affine Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren (Sovago et al. 2001). Beeinflusst wird diese Bindung durch äußere Faktoren wie zum Beispiel die Temperatur (McKinney und Raddatz 2006). Das Bindungsverhalten des Liganden MK801 wird zudem durch die Konzentration von Glutamat und Spermin im Inkubationsmedium beeinflusst (siehe Kap. 4.2.3). Endogene Liganden, die trotz Waschung im Gewebe verbleiben, erschweren als Konkurrenten um freie Rezeptoren die Ligandenbindung. Bedacht werden muss außerdem, dass sich die Selektivität der Liganden für ihren Rezeptor mit zunehmender Konzentration reduziert (McKinney und Raddatz 2006). Zudem binden Liganden, neben ihrer spezifischen Bindung an Rezeptoren, auch unspezifisch an Gewebebestandteile (Manuel et al. 2015). Das Ausmaß dieser unspezifischen Bindung (uB) wird heutzutage durch Anfertigung eines zusätzlichen Bildes dargestellt (vgl. Kapitel 2.8).

Die Konzentration und Bindungsstärke des dafür genutzten Kompetitors, hat somit ebenfalls Einfluss auf die Berechnung der Rezeptordichte. Die Grauwerte der exponierten Filmfolie werden durch die Expositionszeit, die Emissionsstärke des Isotops, den Abstand der Strahlenquelle vom Film, sowie die Dicke des Films beeinflusst (Manuel et al. 2015). Für die Vergleichbarkeit der Werte ist es deswegen wichtig die zur Kalibrierung genutzten Standards mit bekannter Radioaktivitätskonzentration gemeinsam mit Hirnschnitten auf einer Folie zu inkubieren. Bei besonders hellen Folien werden die Grauwerte der Autoradiogramme so auch auf die entsprechend helleren Standards bezogen. Ausgeglichen werden dadurch jedoch keine Artefakte, wie zum Beispiel Luftblasen oder Verunreinigung, die nicht die gesamte Folie betreffen. Dies erschwert einen Vergleich der absoluten Werte von Autoradiogrammen, die auf unterschiedlichen Folien entwickelt wurden, sowie den generellen Vergleich von absoluten Werten zwischen verschiedenen Studien. Bei beidseitigen Veränderungen der Rezeptordichte, kann eine methodische Ursache somit nicht ausgeschlossen werden.

Trotz der genannten Einschränkungen, eignet sich die Methode der quantitativen Rezeptorautoradiographie gut zur Darstellung von Veränderungen der Rezeptordichte. Im Modell der Hemiparkinsonratte dient vor allem die kontralaterale Kontrollseite zum Vergleich. Dabei lassen sich dynamische Entwicklungen wie eine einseitige Hoch- oder Runterregulation der Rezeptoren gut vergleichen. Der Vergleich absoluter Werte kann, unter Beachtung möglicher Unterschiede aufgrund oben genannter methodischer Einflüsse, ebenfalls getätigt werden.

4.2 Ergebnisdiskussion

Im folgenden Abschnitt werden die Veränderungen der einzelnen Rezeptorgruppen diskutiert und in den Kontext der aktuellen Literatur gestellt.

Die größten Rezeptordichten im Striatum zeigen sich für die mGlu2/3-Rezeptoren, gefolgt von AMPA-Rezeptoren (vgl. Kapitel 3.1). Dass AMPA-Rezeptoren im Striatum eine höhere Rezeptordichte aufweisen als Kainat-Rezeptoren, wurde dabei in weiteren Studien beschrieben (Bernard et al. 1996; Zavitsanou et al. 1996).

4.2.1 Veränderungen der AMPA-Rezeptoren

Die Verteilung der AMPA-Rezeptoren im Rattenhirn wurde mehrfach untersucht. Dabei werden AMPA-Rezeptoren, genauso wie Kainat- und NMDA-Rezeptoren, hauptsächlich im Telenzephalon exprimiert. Die höchsten Konzentrationen findet man in der CA1-Region des Hippocampus und in oberflächlichen Schichten des Kortex. Eine moderate Expression wurde für das Striatum und tiefe Kortexschichten beschrieben.

Die niedrigsten Konzentrationen weisen Dienzephalon, Mesenzephalon, Hirnstamm und Kleinhirn auf (Bauer et al. 2005; Baudry et al. 1990; Rainbow et al. 1984; Monaghan et al. 1984).

In mehreren rezeptorautoradiographischen Studien wurde die Anzahl von Bindungsstellen für [³H]AMPA im Striatum beschrieben (siehe Tabelle 1). Unsere Untersuchungen ergaben eine mittlere Rezeptordichte von 2390 fmol/mg Protein. Albin et al. beschrieben in ihrer Studie, mit 2421 fmol/mg Protein einen nahezu identischen Wert. Trotz des vergleichbaren Versuchsaufbaus, beschrieben Bauer et al. eine kleinere Anzahl von Bindungsstellen im Striatum. Möglicherweise ist dieser Unterschied der Verwendung eines anderen Puffermediums oder differierenden Konzentrationen von Kaliumthiocyanat (KSCN) geschuldet. Deutlich niedrigerer Rezeptordichten wurden in früheren Studien beschrieben (Rainbow et al. 1984; Monaghan et al. 1984). Dabei ist zu beachten, dass in diesen Studien kein zusätzliches KSCN im Puffermedium verwendet wurde. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass KSCN die [³H]AMPA-Bindung deutlich steigert, sodass eine Inkubation ohne KSCN, die im Vergleich zu unserer Studie deutlich niedrigeren Werte gut erklärt (Baudry et al. 1990).

Tabelle 1: AMPA-Rezeptordichten im Striatum

Zusammenfassung, der in der Literatur bekannten AMPA-Rezeptordichten im Vergleich zu unseren Ergebnissen (fett gedruckt). Angabe der Werte in fmol/mg Protein; SD zur Vereinfachung nicht dargestellt.

a (Albin et al. 1992) b (Bauer et al. 2005) c (Rainbow et al. 1984) d (Monaghan et al. 1984)
e (Zavitsanou et al. 1996) f (Tarazi et al. 1998b) g (Tarazi et al. 2000) h (Porter et al. 1994)

Rezeptor	Kontrolle	6-OHDA-Läsion kontralateral	6-OHDA-Läsion ipsilateral
AMPA	2390 2421 a 1469 b 236 c 91 d	1903 11000 e 2618*f 3382*g 1757*h	1977 8700 e 2314*f 3400*g 1675*h

Ausführliche Darstellung der einzelnen Studien: siehe Anhang, S. X. Bei Messung mehrerer Striatumanteile wurde ein Mittelwert berechnet; * fmol/mg Gewebe wurde mit Faktor 10 umgerechnet.

Die Auswirkung einer 6-OHDA-Läsion auf die Dichte von AMPA-Rezeptoren im Striatum wurde in mehreren Studien untersucht. Wüllner et al. beschrieben einen Abfall der Rezeptordichte im Striatum um 10 % eine Woche nach Läsion, der drei Monate nach Läsion jedoch nicht mehr nachweisbar war. Ergänzend dazu postulierten Zavitsanou et al. einen Abfall der Rezeptordichte um 21% eine Woche, sowie vier Wochen nach Läsion (vgl. Tabelle 1). Tarazi et al. beschrieben in Studien eine Woche nach Läsion einen Abfall der Rezeptordichte um 11% im medialen und 12% im lateralen Striatum (Tarazi et al. 1998b; Zavitsanou et al. 1996; Wüllner et al. 1994). Weitere Studien konnten keinen Effekt einer 6-OHDA-Läsion auf die Dichte von AMPA-Rezeptoren im Striatum nachweisen (Tarazi et al. 2000; Porter et al. 1994). Auch in postmortem-Studien an Gehirnen von Parkinson-Patienten, ließen sich keine Veränderungen der AMPA-Rezeptordichte im Striatum nachweisen (Ulas et al. 1994).

In unserer Arbeit zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der AMPA-Rezeptordichte nach 6-OHDA-Läsion. Somit können wir einen Sitz von AMPA-Rezeptoren auf dopaminergen Enden nicht bestätigen. Möglicherweise erklären sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Studien durch die verschiedenen Zeitpunkte der Messung. Ein früher Abfall der Rezeptordichte direkt nach Läsion, als Korrelat für einen kleinen Anteil der AMPA-Rezeptoren auf dopaminergen Enden, der zu einem späteren Zeitpunkt nach entsprechender Gegenregulation nicht mehr nachweisbar ist, wäre denkbar. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse von Zavitsanou et al., wonach sich die Rezeptordichten eine Woche und vier Wochen nach Läsion nicht unterscheiden.

In den letzten Jahren wurde die Auswirkung einer 6-OHDA-Läsion auf die einzelnen Rezeptor-Untereinheiten untersucht. Bis heute herrscht Uneinigkeit über eine mögliche Veränderung der GluR1-Untereinheit (Gardoni und Di Luca 2015). So wurde eine Hochregulation der mRNA für GluR1 zwei Wochen nach 6-OHDA-Läsion beschrieben (Tremblay et al. 1995). Ähnliche Veränderungen zeigten sich im MPTP-Modell des Primaten (Betarbet et al. 2000). Im Gegensatz dazu wurde in Einklang mit einer möglichen Adaptation an gesteigerte Glutamatkonzentrationen eine Reduktion der GluR1-mRNA zwei Wochen nach Läsion beschrieben. Es zeigten sich keine Änderungen der GluR2-, GluR3- und GluR4-mRNA (Lai et al. 2003). Weitere Studien konnten keine Veränderung der GluR1-mRNA nachweisen (Kobylecki et al. 2013; Bernard et al. 1996). Ba et al. untersuchten die Dichte der GluR1-Untereinheit immunhistochemisch getrennt an striatalem Gesamtgewebe, sowie an Membranfraktionen. Dabei zeigte sich, bei ausbleibender Veränderung der Gesamtmenge des GluR1-Proteins, eine reduzierte Dichte an Membranen. Zusätzlich beschrieben sie eine reduzierte Phosphorylierung der GluR1-Untereinheit.

Eine 6-OHDA-Läsion könnte somit eine Umverteilung von Untereinheiten ohne Auswirkung auf die Gesamtzahl bewirken (Ba et al. 2006). Unterstützend dazu postulierten Xue et al. einen dopaminergen Einfluss auf die Phosphorylierung der GluR1-Untereinheiten (Xue et al. 2017). Unter Annahme einer Umverteilung der Rezeptoruntereinheiten als Reaktion auf 6-OHDA-Läsion, wäre eine kurzfristige Änderung der Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden und somit Abnahme von Bindungsstellen in rezeptorautoradiographischen Studien denkbar.

Erstmals untersuchten wir in unserer Arbeit die Auswirkung einer intrastriatalen BoNT/A-Injektion auf die Dichte von AMPA-Rezeptoren. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Somit bot sich kein Hinweis auf veränderte Glutamatkonzentrationen im synaptischen Spalt. Ein Einfluss des BoNT/A auf die Glutamat-Ausschüttung im Striatum ist demnach fraglich (vgl. Kapitel 4.3).

4.2.2 Veränderungen der Kainat-Rezeptoren

Die höchsten Konzentrationen von Kainat-Rezeptoren findet man im Telenzephalon. Hohe Konzentrationen dabei zum Beispiel im Neokortex, Cingulum, Bulbus olfactorius und der CA3-Region des Hippocampus (Bauer et al. 2005; Unnerstall und Wamsley 1983; Monaghan und Cotman 1982). Mehrere Studien beschreiben die höchsten Konzentrationen der Kainat-Rezeptoren für das Striatum (Bauer et al. 2005; London und Coyle 1979).

Im Vergleich zu AMPA- und NMDA-Rezeptoren finden sich in der Literatur weniger Studien mit genauen Angaben zur Rezeptordichte der Kainat-Rezeptoren im Striatum. Unsere gemessene Rezeptordichte ordnet sich zwischen zwei weiteren Studien ein (siehe Tabelle 2). Dabei beschreiben Bauer et al. eine deutlich höhere Rezeptordichte von 2805 fmol/mg Protein. Mit [³H]SYM 2081 wurde ein anderer Ligand verwendet. Dabei handelt es sich um einen selektiven Agonisten, der im Gegensatz zu [³H]Kainat keine Affinität zu AMPA-Rezeptoren besitzt (Donevan et al. 1998). Jedoch wurde eine Bindung an gliale Glutamat-Transporter beschrieben, was den im Vergleich zu unserer Studie größeren Wert erklären könnte (Aprico et al. 2001). Allerdings kann auch bei dem von uns verwendeten Liganden [³H]Kainat nicht von einer reinen Kainat-Rezeptor-Bindung ausgegangen werden. Möglicherweise sind trotz geringerer Affinität auch AMPA-Rezeptoren markiert worden (Donevan et al. 1998; Zhou et al. 1997). Wichtig sind des Weiteren die Ligandenkonzentrationen im Puffer-Medium. So wurden für den Liganden Kainat Unterschiede im Bindungsverhalten an hoch-affine und niedrige-affine Rezeptoren beschrieben. Möglicherweise werden je nach Inkubationsbedingungen unterschiedliche Populationen markiert (Zavitsanou et al. 1996). Der unterschiedliche Versuchsaufbau der Studien erschwert somit einen direkten Vergleich der Werte.

In einer weiteren Studie wurde eine mittlere Rezeptordichte von 965 fmol/mg Protein beschrieben (Albin et al. 1992). Trotz des Einsatzes einer wesentlich höheren Ligandenkonzentration, zeigte sich ein geringeres Bindungsverhalten als in unserer Studie. Albin et al. untersuchten die Rezeptordichte in einzelnen Anteilen des Striatums. Dabei fanden sich die höchsten Dichten im lateralen Striatum, die niedrigsten Werte zeigten sich im dorsalen Striatum. Zum direkten Vergleich fassten wir die einzelnen Werte zu einem Mittelwert zusammen, ohne Berücksichtigung eines möglichen Einflusses unterschiedlich großer Messflächen. Im Gegensatz dazu, versuchten wir in unserer Studie den Einfluss der unterschiedlichen Messorte und -flächen durch Ermittlung einer flächengewichteten Dichte zu minimieren. Dies könnte somit eine mögliche Ursache für die differierenden Werte sein.

In allen Versuchsgruppen fällt eine beidseitige Abnahme der Rezeptordichte über die Zeit auf, welche sich unabhängig von der unterschiedlichen Therapie der Gruppen darstellt. Der gleichmäßige Abfall spricht für eine Abnahme der Kainat-Rezeptoren in Folge des zunehmenden Alters der Ratten und gegen methodisch bedingte Unterschiede. Dennoch können diese nicht ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung der hypothetischen Annahme eines Alterseffektes innerhalb der Gruppe der Kainat-Rezeptoren, müsste man mehrere Kontrollgruppen unterschiedlichen Alters möglichst bei gleichen Inkubationsbedingungen auf derselben Folie untersuchen, um einen systematischen Fehler auszuschließen. In der Literatur finden sich nur wenige rezeptorautoradiographische Studien, die sich mit der Auswirkung des Alterungsprozesses auf Rezeptordichten beschäftigen. Die meisten untersuchten dabei hippocampale Strukturen, um mögliche Korrelate für die Verschlechterung der kognitiven Leistung mit zunehmenden Alter zu finden (Wenk und Barnes 2000). Für das Striatum wurde eine Abnahme der Bindung an Kainat- und NMDA-Rezeptoren bei alten Ratten (24 Monate) im Vergleich zu jungen Ratten (4 Monate) beschrieben. Für AMPA-Rezeptoren zeigten sich keine Veränderungen (Nicolle et al. 1996). Kito et al. zeigten einen möglichen Alterseffekt für NMDA-Rezeptoren. Bei Ratten unterschiedlichen Alters (2, 5, 13 und 21 Monate), nahm die [^3H]CPP- und [^3H]Glycin-Bindung im Striatum mit Verlauf der Zeit ab (Kito et al. 1990).

Tabelle 2: Kainat-Rezeptordichten im Striatum

Zusammenfassung, der in der Literatur bekannten Kainat-Rezeptordichten im Vergleich zu unseren Ergebnissen (fett gedruckt). Angabe der Werte in fmol/mg Protein; SD zur Vereinfachung nicht dargestellt.

a (Bauer et al. 2005) b (Albin et al. 1992) c (Tarazi et al. 1998b) d (Zavitsanou et al. 1996)
e (Tarazi et al. 2000)

Rezeptor	Kontrolle	6-OHDA-Läsion kontralateral	6-OHDA-Läsion ipsilateral
Kainat	1189 2805 a 966 b	1117 893*c 3200d 1151*e	1109 794*c 2400d 1382*e

Ausführliche Darstellung der einzelnen Studien: siehe Anhang S. XI. Bei Messung mehrerer Striatumanteile wurde ein Mittelwert berechnet; * fmol/mg Gewebe wurde mit Faktor 10 umgerechnet.

Die Auswirkung einer 6-OHDA-Läsion auf die Dichte von Kainat-Rezeptoren im Striatum wurde mehrfach untersucht (vgl. Tabelle 2). Dabei beschrieben Tarazi et al. 1998 einen Abfall der Kainat-Rezeptordichte eine Woche nach Läsion um 11 % im medialen und 14 % im lateralen Striatum. Wüllner et al. beschrieben in ihrer Arbeit eine Woche nach Läsion ebenfalls einen Abfall der Rezeptordichte um 10 %. Dieser ließ sich drei Monate nach Läsion nicht mehr nachweisen. Weitere Arbeiten beschrieben eine Woche nach Läsion einen Abfall um 26 %. Vier Wochen nach Läsion wurde derselbe Wert gemessen. Ergänzend zur oben genannten Studie, postulierten Tarazi et al. in einer Studie drei Jahre später einen Anstieg der Rezeptordichte fünf Wochen nach Läsion um 20 % (Tarazi et al. 2000). Aus dem Abfall der Rezeptordichte wurde auf einen präsynaptischen Sitz von Kainat-Rezeptoren auf dopaminergen Neuronen geschlossen (Tarazi et al. 1998b; Zavitsanou et al. 1996; Wüllner et al. 1994). Dieser wurde in weiteren Studien postuliert (Tallaksen-Greene et al. 1992). Bei Vergleich der Studien innerhalb der Gruppe um Tarazi können, bei gleichem Versuchsaufbau, Veränderungen aufgrund methodischer Unterschiede weitestgehend ausgeschlossen werden. So könnten die entgegengesetzten Veränderungen der Rezeptordichte zu späterem Zeitpunkt eine Anpassungsreaktion darstellen. Im Widerspruch dazu stehen allerdings fehlende Unterschiede der Rezeptordichte zwischen den zwei Messpunkten in der Studie von Zavitsanou et al.

In unserer Studie zeigten sich zu keinem Zeitpunkt Veränderungen der Kainat-Rezeptordichte nach 6-OHDA-Läsion. Einen in vorherigen Studien postulierten Sitz auf dopaminergen Enden können wir somit nicht unterstützen. Die Ursache für die beschriebenen kontroversen Ergebnisse bleibt unklar. Neben den genannten Unterschieden im Messzeitpunkt, könnte auch ein unterschiedlich großes Ausmaß der dopaminergen Degeneration nach Läsion einen Einfluss haben.

Postmortem-Studien an Hirnen von Parkinson-Patienten ergaben keine Veränderungen der Kainat-Rezeptoren im Striatum (Ulas et al. 1994).

Nach BoNT/A-Injektion in das Striatum stellte sich eine leichte Tendenz zur Reduktion der Kainat-Rezeptordichte ipsilateral dar, die jedoch nicht signifikant war. Die Gruppen der BoNT/A-therapierten Kontrolltiere und weniger auch die Gruppen der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten, wiesen so eine Seitendifferenz zwischen dem linken und rechten Striatum auf, die sich in den scheinbehandelten Gruppen nicht eindeutig darstellte. Weiterhin fiel auf, dass die beschriebenen Veränderungen mit der Zeit nachließen. Dabei unterstützt die Abnahme im Verlauf der Zeit die Hypothese, dass diese Veränderungen durch BoNT/A-Injektion induziert sein könnten, denn in Studien unserer Gruppe wurde beschrieben, dass die BoNT/A-Wirkung im Striatum nur für ca. sechs Monate anhält (Wree et al. 2011). Dass diese Veränderung Folge einer präsynaptischen Hemmung der Transmitterausschüttung durch BoNT/A ist, scheint bei fehlender Veränderungen der AMPA-Rezeptoren eher unwahrscheinlich. Denkbar wäre jedoch der Wegfall eines cholinergen Einflusses auf die Dichte von Kainat-Rezeptoren. So wurde in einer Studie die Steigerung der Kainat-Rezeptor-Aktivität nach Aktivierung muskarinerger ACh-Rezeptoren gezeigt (Benveniste et al. 2010). Wie sich diese Interaktion genau gestalten könnte bleibt unklar. Möglich wäre eine Beeinflussung der Kainat-Rezeptoren über intrazelluläre Signalproteine. So wurde in einer Studie die Regulation der GluR5-Untereinheit durch PKC-induzierte Phosphorylierung gezeigt (Cho et al. 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass SNAP-25 unabhängig von seiner Rolle im SNARE-Komplex am Transport von Kainat-Rezeptoren beteiligt ist (Selak et al. 2009). Ein direkter Eingriff des BoNT/A in diesen Signalweg wäre somit ebenfalls denkbar (vgl. Abbildung 47). Ohne genaue Kenntnisse der Zusammenhänge sind diese vermuteten Einflüssen jedoch rein hypothetisch.

4.2.3 Veränderungen der NMDA-Rezeptoren

Die Verteilung der NMDA-Rezeptoren im Rattenhirn wurde mehrfach im Rahmen rezeptorautoradiographischer Studien untersucht. Entsprechend ihrer Bedeutung für Hirnfunktionen wie Lernen und Gedächtnis, findet man die höchsten Rezeptordichten der NMDA-Rezeptoren in der CA1-Region des Hippocampus und im Gyrus dentatus. Für das Striatum wurde im Vergleich dazu eine moderte Expression beschrieben (Bauer et al. 2005; Jarvis et al. 1987).

Unsere gemessene Rezeptordichte von 1208 fmol/mg Protein reiht sich gut in die bisher veröffentlichten Studien ein (vgl. Tabelle 3). Unter vergleichbaren Inkubationsbedingungen beschrieben Bauer et al. 2005 eine mittlere Rezeptordichte von 1149 fmol/mg Protein.

Subramaniam und McGonigle veröffentlichten einen Wert von 1028 fmol/mg Protein. Nach Umrechnung der von Jang et al. publizierten Ergebnisse mit Faktor 10, zeigten sich im Vergleich zu unser ermittelten Rezeptordichte höhere Werte. Hierbei könnte die höhere Konzentration des Liganden im Inkubationsmedium eine Rolle spielen (Jang et al. 1999). Wesentlich niedrigere Rezeptordichten wurden von Albin et al. und Jarvis et al. beschrieben (siehe Tabelle 3). Allerdings erklären sich diese Unterschiede bei Vergleich des Versuchsaufbaus. Der verwendete Ligand [^3H]Glutamat bindet an die reguläre Bindungsstelle des Rezeptors und steht somit in direkter Konkurrenz zu endogenem Glutamat. Da auch nach gründlicher Waschung ein Restverbleib von Glutamat im Gewebe nicht ausgeschlossen werden kann, reduziert sich die Anzahl freier Bindungsstellen für den radioaktiv markierten Liganden (Subramaniam und McGonigle 1991). Im Gegensatz dazu, bindet MK801 als nicht-kompetetiver Antagonist mit hoher Affinität an die PCP-Bindungsstelle im Inneren des NMDA-Kanals (Sakurai et al. 1991). MK801 bindet somit unabhängig von Glutamat, was zu einem höheren Bindungspotential führt. Die unterschiedlichen Ergebnisse von Sakurai et al. im Vergleich zu unserer Arbeit, könnten durch den fehlenden Zusatz von bindungssteigernden Liganden verursacht sein. So wurde mehrfach beschrieben, dass der Zusatz von Modulatoren wie Glycin, Glutamat sowie Spermin und Spermidin in der Inkubationslösung das Bindungspotential des Antagonisten deutlich steigert (Subramaniam und McGonigle 1991).

Tabelle 3: NMDA-Rezeptordichten im Striatum

Zusammenfassung, der in der Literatur bekannten NMDA-Rezeptordichten im Vergleich zu unseren Ergebnissen (fett gedruckt). Angabe der Werte in fmol/mg Protein; SD zur Vereinfachung nicht dargestellt.

a (Bauer et al. 2005) b (Subramaniam und McGonigle 1991) c (Jang et al. 1999) d (Albin et al. 1992)
e (Jarvis et al. 1987) f (Sakurai et al. 1991) g (Tarazi et al. 2000) h (Araki et al. 2000)
i (Porter et al. 1994) k (Tarazi et al. 1998b)

Rezeptor	Kontrolle	6-OHDA-Läsion kontralateral	6-OHDA-Läsion ipsilateral
NMDA	1208 1149 a 1028 b 1797*c 676 d 570*e 384 f	1222 1719*g 2250*h 828*i 1240*k	1282 1674*g 2145*h 778*i 1029*k

Ausführliche Darstellung der einzelnen Studien: siehe Anhang S. XII. Bei Messung mehrerer Striatumanteile wurde ein Mittelwert berechnet; * fmol/mg Gewebe wurde mit Faktor 10 umgerechnet.

Die Auswirkung einer 6-OHDA-Läsion auf die Dichte von NMDA-Rezeptoren im Striatum wurde mehrfach untersucht und wird kontrovers diskutiert (siehe Tabelle 3). Mehrere Studien beschrieben eine Reduktion der Bindung an NMDA-Rezeptoren nach 6-OHDA-Läsion (Wang et al. 2014; Yan et al. 2011; Tarazi et al. 1998b; Porter et al. 1994). Aufgrund ihrer Ergebnisse postulierten sie einen präsynaptischen Sitz auf dopaminergen Neuronen. Dabei wurde eine präsynaptische Regulation der Dopamin-Ausschüttung durch NMDA-Rezeptoren mehrfach vermutet (Tarazi et al. 2000; Morari et al. 1998; Wheeler et al. 1995; Wheeler et al. 1995). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte eine Reduktion der Dichte im Rahmen einer Adaptation an gesteigerte glutamaterge Übertragung im Striatum sein (Wang et al. 2014). Auffällig ist der Unterschied von Ergebnissen zweier Studien innerhalb derselben Gruppe. Tarazi et al. konnten fünf Wochen nach Läsion keine Veränderungen der NMDA-Rezeptoren feststellen. In einer vorausgehenden Studie beschrieben sie eine Woche nach Läsion hingegen eine Reduktion um 16 %. Dabei unterschieden sich die Studien bezüglich des Versuchsaufbaus nicht. Die Autoren gingen davon aus, dass die Messungen eine Woche nach Läsion durch den frühen Zeitpunkt unabhängig von gegenregulatorischen Prozessen waren. Die kontroversen Ergebnisse eine Woche und fünf Wochen nach Läsion, könnten tatsächlich durch Verlust einer kleinen Population von NMDA-Rezeptoren auf dopaminergen Enden, der durch gegenregulatorische Maßnahmen innerhalb weniger Wochen ausgeglichen wurde, verursacht sein (Tarazi et al. 2000; Tarazi et al. 1998b). Passend dazu wiesen Wüllner et al. einen Abfall der Rezeptordichte um 10 % eine Woche nach 6-OHDA-Läsion nach. Drei Monate nach 6-OHDA wurde in der gleichen Studie ein Anstieg der Rezeptordichte um 13 % beschrieben (Wüllner et al. 1994).

In unserer Arbeit konnten wir keine signifikante Veränderung der NMDA-Rezeptordichte nach 6-OHDA-Läsion im Striatum nachweisen. Weitere Studien mit vergleichbaren Versuchsaufbau berichten ebenfalls keine Veränderung der Rezeptordichte nach 6-OHDA-Läsion (Araki et al. 2000; Tarazi et al. 2000). So konnten wir den mehrfach vermuteten präsynaptischen Sitz von NMDA-Rezeptoren auf nigrostriatalen Enden nicht bestätigen. Allerdings erfolgten unsere ersten Messungen erst drei Wochen nach Läsion, eine Veränderungen direkt nach Läsion kann somit nicht ausgeschlossen werden. Unklar bleibt der Unterschied zu Studien mit vergleichbaren Versuchsaufbau, die eine Reduktion der MK801-Bindung beschrieben (Wang et al. 2014; Yan et al. 2011).

In den letzten Jahren wurden zusätzlich Studien über Veränderungen der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten nach 6-OHDA-Läsion veröffentlicht. Gan et al. berichteten drei Wochen nach Läsion von einer Hochregulation der NR1/NR2B-Rezeptoren ohne Veränderung von NR1/NR2A-Rezeptoren. Zusätzlich wurde in zwei weiteren Studien eine gesteigerte Konzentration von NR1-mRNA nach Läsion beschrieben (Gan et al. 2014; Lai et al. 2003; Tremblay et al. 1995). Im Gegensatz dazu, zeigten mehrere Arbeiten einen Verlust der Dichte von NR1- und NR2B-Untereinheiten nach 6-OHDA-Läsion. Dies wurde als mögliche Adaptation an gesteigerte Glutamat-Ausschüttung der kortikostriatalen Synapsen beurteilt. Dunah et al. zeigten zudem eine Abnahme der Phosphorylierung an NR1- und NR2B-Untereinheiten (Fiorentini et al. 2006; Betarbet et al. 2004; Dunah et al. 2000). Dabei wurde in den letzten Jahren mehrfach eine Regulation der NMDA-Rezeptoren durch Phosphorylierung ihrer Untereinheiten beschrieben, die möglicherweise unter dopaminergen Einfluss steht (siehe Kap. 1.3.4). Ein Wegfall des Dopamin-Einflusses könnte somit zu Veränderungen der Zusammensetzung von NMDA-Rezeptoren führen (Gardoni und Di Luca 2015; Fiorentini et al. 2006). Diese Hypothese unterstützend, zeigte eine Studie die Wiederherstellung des ursprünglichen Phosphorylierungszustands nach Beginn einer L-DOPA-Therapie. Wie diese Veränderungen genau aussehen bleibt unklar. Dabei scheint das Ausmaß der 6-OHDA-Läsion Einfluss auf die unterschiedlichen Veränderungen der Untereinheiten zu haben (Gardoni und Di Luca 2015; Gan et al. 2014). Trotz diverser Studien hat sich so bisher keine eindeutige Meinung über die Wirkung von 6-OHDA auf die Dichte von NMDA-Rezeptoren im Striatum der Ratte herauskristallisiert. Post-mortem Studien an menschlichen Hirnen von Parkinson-Patienten berichten ebenfalls kontroverse Ergebnisse. Holemans et al. konnten keine veränderte MK801-Bindung bei Parkinson-Patienten feststellen, Ulas et al. beschrieben eine gesteigerte [³H]Glutamat-Bindung an NMDA-Rezeptoren bei Parkinson-Patienten.

Die Auswirkung einer BoNT/A-Injektion auf die NMDA-Rezeptordichte im Striatum wurde in unserer Arbeit das erste Mal untersucht. Es konnten keine signifikanten Veränderungen der NMDA-Rezeptordichte dargestellt werden. Anlass zur Diskussion bietet eine leichte Tendenz zur Reduktion der Rezeptordichte ipsilateral nach BoNT/A-Gabe. Diese könnte, wie im vorherigen Kapitel für den Kainat-Rezeptor diskutiert, durch Interaktionen zwischen cholinergen Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren an der Postsynapse bedingt sein. Dabei würde es sich um einen reinen BoNT/A-Effekt unabhängig von der 6-OHDA-Läsion handeln, denn die Tendenz zeigt sich in Gruppe LB, nicht jedoch bei LV. Diese Annahme unterstützend, beschrieben Marino et al. in ihrer Arbeit eine Steigerung der Ströme durch NMDA-Rezeptoren nach Aktivierung metabotroper ACh-Rezeptoren (Marino et al. 1998).

Weiterhin wurde auch für mGlu-Rezeptoren eine Förderung der NMDA-Rezeptor-Aktivität postuliert (Cheng et al. 2013; Lan et al. 2001). Alle Studien gingen dabei von einer Beteiligung der PKC aus. In den letzten Jahren wurde diese PKC-abhängige Regulation mit einer Phosphorylierung von SNAP-25 verknüpft (Cheng et al. 2013; Lau et al. 2010; Lan et al. 2001). Somit wäre zusätzlich zur Annahme eines reduzierten cholinergen Einflusses auch eine direkte Beeinflussung der Rezeptordichte durch Hemmung von SNAP-25 als Ursache für die beschriebenen Veränderungen denkbar (vgl. Abbildung 47). Diese Überlegungen sind aufgrund fehlender Signifikanz jedoch rein hypothetisch und bedürfen weiterer Untersuchungen.

4.2.4 Veränderungen der mGlu2/3-Rezeptoren

Die Dichte der mGlu2/3-Rezeptoren im Striatum der Ratte wurde mehrfach untersucht. Wright et al. fanden die höchsten Rezeptordichten für mGlu2/3-Rezeptoren im Striatum, sowie Kortex, Nucleus accumbens, Bulbus olfaktorius und Gyrus dentatus. Petralia et al. beschrieben eine leichte bis moderate Expression der mGlu2/3-Rezeptoren im Striatum. Innerhalb der Gruppe der metabotropen Rezeptoren wurde für die mGlu2/3-Rezeptoren, im Vergleich zu mGlu5, eine niedrige bis moderate Expression beschrieben (Ossowska et al. 2002; Wright et al. 2001; Petralia et al. 1996). In-situ-Hybridisierungsstudien unterschieden im Vorkommen der mRNA für die Untergruppen mGlu2 und mGlu3. Dabei stellte sich im Striatum vor allem mGlu3-mRNA dar. mGlu2-mRNA war dort im Vergleich zu anderen Regionen nur gering exprimiert (Rodriguez-Puertas et al. 1999; Schaffhauser et al. 1998; Testa et al. 1994; Ohishi et al. 1993). Im menschlichen Gehirn konnte eine weite Verbreitung von mGlu2-Rezeptoren nachgewiesen werden, mit hoher Dichte in kortikalen Regionen, sowie in den Basalganglien (Phillips et al. 2000).

In unserer Studie ermittelten wir eine Rezeptordichte von durchschnittlich 3472 fmol/mg Protein im Striatum von unbehandelten Kontrolltieren. Wright et al. beschrieben eine Rezeptordichte von 1026 fmol/mg Protein. Dabei wurde mit [³H]LY341,495 derselbe Ligand unter vergleichbaren Inkubationsbedingungen eingesetzt. Im Gegensatz dazu, wurde in weiteren Studien ein als mGlu2-Rezeptor-selektiv beschriebener Ligand verwendet (Richards et al. 2005; Schaffhauser et al. 1998). Unsere Ergebnisse ordnen sich in den Kontext dieser Studien ein (vgl. Tabelle 4). Ein direkter Vergleich der Werte wird jedoch aufgrund der unterschiedlichen Affinität der verwendeten Liganden zu mGlu2- oder mGlu3-Rezeptoren erschwert. Dabei kann auch für den von uns verwendeten selektiven mGlu2/3-Rezeptor-Antagonisten [³H]LY341,495 eine unterschiedliche Affinität zu den beiden Untergruppen nicht ausgeschlossen werden (Wright et al. 2001).

Tabelle 4: mGlu2/3-Rezeptordichten im Striatum

Zusammenfassung, der in der Literatur bekannten mGlu2/3-Rezeptordichten im Vergleich zu unseren Ergebnissen (fett gedruckt). Angabe der Werte in fmol/mg Protein; SD zur Vereinfachung nicht dargestellt.

a (Wright et al. 2001) b (Richards et al. 2005) c (Schaffhauser et al. 1998) d (Picconi et al. 2002)

Rezeptor	Kontrolle	6-OHDA-Läsion kontralateral	6-OHDA-Läsion ipsilateral
mGlu2/3	3472 1026 a	3041 1407 d	3095 2335 d
mGlu2	6000 b 3180 c		

Ausführliche Darstellung der einzelnen Studien: siehe Anhang, S. XV.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden nur wenige Studien zur Auswirkung einer 6-OHDA-Läsion auf die mGlu2/3-Rezeptordichte im Striatum der Ratte veröffentlicht (siehe Tabelle 4). Picconi et al. setzten ebenfalls die quantitative in-vitro-Rezeptorautoradiographie ein. Sie beschrieben einen Anstieg der Dichte von mGlu2/3-Rezeptoren im Striatum nach 6-OHDA-Läsion (Picconi et al. 2002). In-situ-Hybridisierungsstudien zeigten eine Hochregulation der mRNA-Expression für mGlu3-Rezeptoren im ipsilateralen Striatum (Rodriguez-Puertas et al. 1999). Gegenteilige Ergebnisse lieferten Messenger et al.. Sie wiesen nach 6-OHDA-Läsion eine Reduktion der Expression von mGlu3-Rezeptor-mRNA im Striatum um 11,7 % nach (Messenger et al. 2002).

Im Gegensatz zu den genannten Studien konnten wir keine Veränderung der mGlu2/3-Rezeptordichte nach 6-OHDA-Läsion feststellen. Dabei sind unsere Ergebnisse vereinbar mit einem präsynaptischen Sitz von mGlu2/3-Rezeptoren auf kortiko- und thalamostriatalen Terminalen. Aufgrund ausbleibender Veränderung der Rezeptordichte nach 6-OHDA-Läsion, konnten wir einen präsynaptischen Sitz auf dopaminergen Enden nicht nachweisen. Ein Grund für die kontroversen Ergebnisse könnte der Einsatz unterschiedlicher Methoden sein. Picconi et al. untersuchten in ihrer Studie, im Gegensatz zu unserer Arbeit keine Hirnschnitte, sondern homogenisiertes Gewebe. Möglicherweise kam es im Rahmen der Materialverarbeitung zu Zellschäden, die einen zusätzlichen Angriff an intrazellulären Rezeptorproteinen ermöglichten. Rodrigues-Puertas et al. postulieren eine D1-vermittelte Regulation der Glutamat-Ausschüttung über Beeinflussung von mGlu3-Rezeptoren an der Präsynapse. Hinweise für eine gesteigerte Dichte von mGlu3-Rezeptoren zeigten sich in unserer Studie nicht. Jedoch ermöglicht die Methode der quantitativen Rezeptorautoradiographie keine Aussage über die Expression der Rezeptor-mRNA. Eine Veränderung können wir somit nicht ausschließen.

Inwieweit eine 6-OHDA-Läsion die Proteinsynthese der mGlu2/3-Rezeptoren beeinflusst und ob die Veränderungen in Neuronen oder Gliazellen stattfinden, bleibt somit unklar (Messenger et al. 2002; Rodriguez-Puertas et al. 1999). Die Auswirkungen von 6-OHDA auf die Dichte von mGlu2/3-Rezeptoren müssen demnach weiter untersucht werden.

In unserer Studie beschäftigten wir uns erstmalig mit der Auswirkung einer intrastriatalen BoNT/A-Injektion auf die Dichte von mGlu2/3-Rezeptoren. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Rezeptordichte im Striatum der gesunden Ratte. In der Gruppe der BoNT/A-therapierten Hemiparkinsonratten zeigte sich jedoch eine Tendenz zu größeren Rezeptordichten der Striata ipsilateral zur Läsion. Die Ursachen dafür bleiben unklar. Bei fehlendem Korrelat der beschriebenen Veränderung in den Gruppen der rein 6-OHDA-läsionierten sowie rein BoNT/A-therapierten Tiere, wäre sie nur durch das Zusammenspiel von dopaminerger Denervierung und BoNT/A-Injektion erklärbar. Eine weitere Ursache könnte die zweite stereotaktische Operation sein, denn die scheintherapierten Gruppen zeigten ebenfalls leicht höhere ipsilaterale Werte. Die tatsächliche Existenz eines Anstiegs der ipsilateralen Rezeptordichte nach 6-OHDA-Läsion und BoNT/A-Therapie, ist unter Einbezug der in den Scatterplots dargestellten breiten Streuung der Werten jedoch kritisch zu sehen.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Eine intrastriatale BoNT/A-Injektion scheint das glutamaterge Transmittersystem nicht wesentlich zu beeinflussen. Dabei wurde die Existenz von SNAP-25 in glutamatergen Enden durch mehrere Studien nachgewiesen und auch eine Hemmung der Transmitterfreisetzung aus glutamatergen Synaptosomen durch BoNT/A wurde in-vitro gezeigt (Verderio et al. 2007; Bozzi et al. 2006). Zudem wurde von einer Reduktion der Glutamat-Ausschüttung im Hippocampus der Ratte nach lokaler BoNT/E-Injektion berichtet (Antonucci et al. 2010; Costantin et al. 2005). Bezüglich einer möglichen Auswirkung von reduzierten Transmitterkonzentrationen auf die Rezeptordichte, wurde im Rahmen weiterer rezeptorautoradiographischen Studien unserer Gruppe für ACh- und Dopamin-Rezeptoren eine Hochregulation der Rezeptoren gezeigt. Die Existenz von Veränderungen, die durch unsere Methode nicht erkannt wurden, ist deswegen eher unwahrscheinlich. Zwar wurden die Vorgänge an der Präsynapse in unserer Studie nicht untersucht, jedoch könnte man aufgrund unserer Ergebnisse und unter Berücksichtigung der oben genannten Literatur vermuten, dass BoNT/A die Glutamat-Freisetzung im Striatum nicht wesentlich beeinflusst. Somit stellt sich die Frage, warum sich die Ergebnisse unserer Studie von anderen unterscheiden.

Dabei ist einerseits zu berücksichtigen, dass Costantin et al. in ihrer Studie BoNT/E verwendeten. Obwohl es mit SNAP-25 am gleichen Zielprotein wie BoNT/A angreift, unterscheidet es sich möglicherweise in seiner Wirkung auf glutamaterge Synapsen. Des Weiteren wurde eine konzentrationsabhängige Selektivität von BoNT gezeigt (Verderio et al. 2007). Möglicherweise ist die in unserer Studie verwendete Konzentration von 2x 0,5 ng BoNT/A nicht ausreichend um auch die Transmitterausschüttung des glutamatergen Systems zu beeinflussen. Zudem könnte der Injektionsort eine Rolle spielen. Neurone des Hippocampus exprimieren möglicherweise andere Oberflächenrezeptoren für die Aufnahme der BoNT als Neurone des Striatums.

Die leichte Tendenz zur Reduktion der Kainat- und geringer auch NMDA-Rezeptordichte nach intrastriataler BoNT/A-Injektion wurde in den vorherigen Kapiteln beschrieben (vgl. Kapitel 4.2.2, 4.2.3). Sollten diese Veränderungen durch Wegfall eines cholinergen Einflusses auf die Regulation der Rezeptoren verursacht sein, so würde daraus keine Einschränkung für den therapeutischen Einsatz entstehen. Denn BoNT/A würde im Rahmen der Erkrankungen an einem System mit gesteigerten ACh-Konzentrationen angreifen und somit der Wiederherstellung der natürlichen Konzentration dienen.

Eine direkte Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch Spaltung von SNAP-25 könnte jedoch unerwünschte Folgen haben. Über die Regulation der Rezeptordichte an der Postsynapse wurden in den letzten Jahren, insbesondere für den NMDA-Rezeptor, mehrere Arbeiten publiziert. Unter Zusammenfassung dieser Literatur wäre folgender Signalweg denkbar (siehe Abbildung 47).

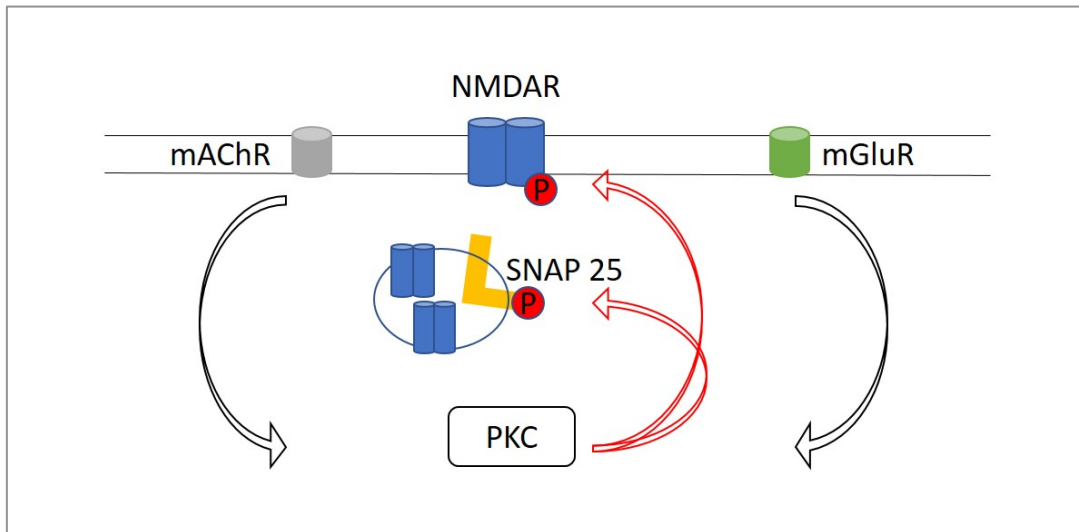


Abbildung 47: Steuerung des NMDA-Rezeptor-Transport durch SNAP-25?

Die PKC beeinflusst die Funktion des NMDA-Rezeptors (NMDAR) über Phosphorylierung seiner Untereinheiten (Dunah et al. 2000). Des Weiteren reguliert sie seine Dichte durch Angriff an Rezeptor-assoziierten Proteinen wie z.B. SNAP-25. Phosphoryliertes SNAP-25 vermittelt den Transport von NMDA-Rezeptor-tragenden Vesikeln zur Plasmamembran (Lau et al. 2010). Über Aktivierung der PKC haben auch mACh- und mGlu-Rezeptoren (mAChR, mGluR) Einfluss auf den Signalweg (Cheng et al. 2013; Benveniste et al. 2010).

Auf Grundlage des dargestellten Signalweges könnte sowohl eine Abnahme der cholinergen Transmitterausschüttung, als auch eine direkte Hemmung von SNAP-25 durch BoNT/A, zu einer Reduktion der Rezeptordichte führen. Unter Annahme der Beteiligung von SNAP-25, würde sich auch erklären warum die Veränderungen nicht bei AMPA-Rezeptoren auftraten, denn für den Transport der AMPA-Rezeptoren konnte bisher keine Verbindung zu SNAP-25 nachgewiesen werden (Lau et al. 2010). Der fehlende Einfluss auf mGlu2/3-Rezeptoren erklärt sich möglicherweise durch ihren primär präsynaptischen Sitz. Eine Regulation durch PKC und metabotrope ACh-Rezeptoren wurde auch für den Transport des Kainat-Rezeptors postuliert (Benveniste et al. 2010; Selak et al. 2009; Cho et al. 2003). Selak et al. beschrieben jedoch im Gegensatz zu NMDA-Rezeptoren, für Kainat-Rezeptoren eine Regulation der Internalisierung durch SNAP-25. Diese Annahme widerspricht unser Hypothese eines direkten Angriffs des BoNT/A am SNAP-25-regulierten Rezeptortransport, denn nach Proteinspaltung käme es zu einer reduzierten Internalisierung der Rezeptoren und somit eher zu einer Zunahme der Kainat-Rezeptordichte.

Abgesehen von dieser Diskrepanz stellt sich zusätzlich die Frage, warum sich die intrastriatale BoNT/A-Injektion auf SNAP-25 der Postsynapsen, nicht jedoch auf die durch SNAP-25 gesteuerte Transmitterausschüttung an Präsynapsen (siehe S.82) auswirken sollte. Folglich bedarf es weiterer Untersuchungen zur Aufklärung der BoNT/A-Wirkung an unterschiedlichen Neuronen und vor allem auch einem Vergleich der Wirkung an Dendriten und präsynaptischen Membranen. Dass die Aufnahme des Toxins die Existenz bestimmter Oberflächenrezeptoren voraussetzt, wurde gezeigt (Verderio et al. 2007). Möglicherweise unterscheiden sich die Rezeptoren für BoNT/A an präsynaptischen und postsynaptischen Membranen der glutamatergen Synapsen im Striatum. Zudem scheint ein umfassendes Verständnis der Signalwege des Rezeptor-Transportes an der postsynaptischen Membran wesentlich für die weitere Entwicklung einer intrastriatalen BoNT/A-Therapie zu sein.

Mit den Glutamatrezeptoren wurde in dieser Arbeit ein wichtiges System für die Funktionen des ZNS untersucht. Intrastriatale BoNT/A-Injektion scheint unter unseren Versuchsbedingungen das glutamaterge System nicht signifikant zu beeinflussen. Somit verbleibt die intrastriatale BoNT/A-Injektion als eine potentielle Therapieoption des Morbus Parkinson bestehen.

5 Zusammenfassung

Aus vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe geht hervor, dass einseitige BoNT/A-Injektion in das Striatum von Hemiparkinsonratten (6-OHDA-Modell) die motorischen Symptome der Erkrankung verbessert. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Auswirkung einer intrastriatalen BoNT/A-Injektion auf die Dichte von Glutamatrezeptoren im Striatum. Dabei wurden die vier verschiedenen Rezeptorgruppen AMPA-, Kainat-, NMDA- und mGlu2/3-Rezeptoren einzeln untersucht.

Zur Darstellung der Rezeptordichte im Striatum wurde die Methode der quantitativen Rezeptorautoradiographie eingesetzt. Untersucht wurden die Gehirne von adulten Wistar-Ratten aus fünf verschiedenen Versuchsgruppen: Gruppe B (gesunde Tiere mit BoNT/A-Injektion in das rechte Striatum), Gruppe LB (rechtsseitig 6-OHDA-läsionierte Tiere mit BoNT/A-Injektion in das rechte Striatum), Gruppe L (rechtsseitig 6-OHDA-läsionierte Tiere), Gruppe LV (rechtsseitig 6-OHDA-läsionierte Tiere mit Injektion einer Placebo-Lösung), sowie Gruppe K (gesunde Tiere ohne Therapie). Nach Entnahme und Aufarbeitung der Gehirne wurden koronare Schnitte angefertigt, welche in einem Puffermedium mit Tritium-markierten, spezifischen Rezeptorliganden inkubiert wurden. Zur Darstellung der rezeptorgebundenen Liganden, wurden β -strahlenempfindliche Filme mit den radioaktiv markierten Schnitten exponiert. Die Messung der digitalisierten Rezeptorautoradiogramme erfolgte mithilfe des Programms MCID Analysis v7.0. Anhand von aus Standards erstellten Kalibrierungswerten, konnte aus den Grauwerten eine Liganden-Konzentrationen berechnet werden. Unter Berücksichtigung ligandenspezifischer Konstanten, wurden die gemessenen Werte der einzelnen Schnittebenen des Striatums zu einer flächengewichteten, mittleren Rezeptordichte in fmol/mg Protein zusammengefasst.

Die größten Rezeptordichten zeigten mGlu2/3-Rezeptoren und AMPA-Rezeptoren mit einer mittleren Rezeptordichte von 3472 fmol/mg Protein und 2390 fmol/mg Protein. Deutlich geringere Werte ergaben sich für die Kainat-Rezeptoren mit 1189 fmol/mg Protein und NMDA-Rezeptoren mit 1208 fmol/mg Protein. Eine 6-OHDA-Läsion des rechten medialen Vorderhirnbündels führte zu keiner Veränderung der Dichte von AMPA-, Kainat-, NMDA- oder mGlu2/3-Rezeptoren. Es ergab sich somit kein Hinweis für einen Sitz der Glutamatrezeptoren auf Enden von dopaminergen Projektionsneuronen der Substantia nigra pars compacta. Die Gruppen B und LB zeigten eine nicht signifikante Tendenz zur Reduktion der Kainat- und NMDA-Rezeptordichte nach BoNT/A-Injektion. Weder bei gesunden Tieren, noch bei Hemiparkinsonratten, wirkte sich eine intrastriatale BoNT/A-Injektion auf die Dichte von AMPA- oder mGlu2/3-Rezeptoren aus.

Zusammengefasst führte eine intrastriatale BoNT/A-Injektion in unserer Studie zu keinen signifikanten Veränderungen der Dichte von Glutamatrezeptoren. Die intrastriatale BoNT/A-Injektion bleibt somit als potentielle Therapieoption des Morbus Parkinson bestehen.

6 Thesen

1. Im Rahmen des Morbus Parkinson kommt es zu einer Überaktivität der cholinergen Interneurone im Striatum.
2. BoNT/A ist ein potentes Neurotoxin und hemmt die Transmitterausschüttung an cholinergen Synapsen über Spaltung von SNAP-25.
3. Intrastriatale BoNT/A-Injektion hebt im 6-OHDA-Modell der Ratte (Hemiparkinsonmodell) die apomorphininduzierten Rotationen für einen Zeitraum von drei Monaten auf.
4. Die Verteilung der Glutamaterezeptoren im Striatum wurde mithilfe der quantitativen Rezeptorautoradiographie untersucht.
5. AMPA-, Kainat-, NMDA- und mGlu2/3-Rezeptoren werden im Striatum exprimiert.
6. Die größten Rezeptordichten zeigen mGlu2/3-Rezeptoren mit einer mittleren Rezeptordichte von 3472 fmol/mg Protein.
7. Die mittlere Rezeptordichte der AMPA-Rezeptoren im Striatum beträgt 2390 fmol/mg Protein.
8. Kainat- und NMDA-Rezeptoren weisen mit 1189 fmol/mg Protein und 1208 fmol/mg Protein deutlich kleinere Werte auf.
9. Möglicherweise kommt es mit zunehmendem Alter zu einer Abnahme der Dichte von Kainat-Rezeptoren im Striatum.
10. Eine dopaminerge Denervierung des Striatums durch 6-OHDA-Läsion des medialen Vorderhirnbündels hat keinen Einfluss auf die Dichte von Glutamaterezeptoren im Striatum.
11. Unsere Studie ergab keinen Hinweis für einen Sitz der Glutamaterezeptoren auf präsynaptischen Enden von dopaminergen Projektionsneuronen der Substantia nigra pars compacta.
12. SNAP-25 spielt auch bei vesikulären Transportvorgängen an der Postsynapse eine wichtige Rolle.
13. Intrastriatale BoNT/A-Injektion beeinflusst über Spaltung von SNAP-25 möglicherweise den postsynaptischen Transport von NMDA- und Kainat-Rezeptoren im Striatum.
14. Intrastriatale BoNT/A-Injektion wirkt sich nicht auf die Dichte von AMPA- oder mGlu2/3-Rezeptoren im Striatum aus.
15. Intrastriatale BoNT/A-Injektion könnte in Zukunft eine weitere Option für die Therapie des Morbus Parkinson darstellen.

7 Literaturverzeichnis

Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12:366–375.

Albin RL, Makowiec RL, Hollingsworth ZR, Dure, L S 4th, Penney JB, Young AB (1992) Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience.* 46:35–48.

Almaric M, Lopez S, Goudet C, Fisone G, Battaglia G, Nicoletti F, Pin J-P, Acher F (2013) Group III and subtype 4 metabotropic glutamate receptor agonists: Discovery and pathophysiological applications in Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 66:53–64.

Antipova V, Hawlitschka A, Mix E, Schmitt O, Dräger D, Benecke R, Wree A (2013) Behavioral and structural effects of unilateral intrastriatal injections of botulinum neurotoxin a in the rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 91:838–847.

Antonucci F, Cerri C, Maya Vetencourt JF, Caleo M (2010) Acute neuroprotection by the synaptic blocker botulinum neurotoxin E in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Neuroscience.* 169:395–401.

Aprico K, Beart PM, Lawrence AJ, Crawford D, O'Shea RD (2001) 3H(2S,4R)4Methylglutamate: a novel ligand for the characterization of glutamate transporters. *J Neurochem.* 77:1218–1225.

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.

Ascherio A, Schwarzschild MA (2016) The epidemiology of Parkinson's disease; Risk factors and prevention. *Lancet Neurol.* 15:1257–1272.

Ashton AC, Dolly JO (1988) Characterization of the inhibitory action of botulinum neurotoxin type A on the release of several transmitters from rat cerebrocortical synaptosomes. *J Neurochem.* 50:1808–1816.

Ba M, Kong M, Yang H, Ma G, Lu G, Chen S, Liu Z (2006) Changes in subcellular distribution and phosphorylation of GluR1 in lesioned striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned and l-dopa-treated rats. *Neurochem Res.* 31:1337–1347.

Baudry M, Monaghan D, Cotman C, Altar CA (1990) Regional distribution of alpha-3Hamino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid binding sites in rat brain; Effect of chemical modification of SH- groups in tissue sections. *J Neurochem.* 54:1682–1688.

Bauer A, Zilles K, Matusch A, Holzmann C, Riess O, Horsten S von (2005) Regional and subtype selective changes of neurotransmitter receptor density in a rat transgenic for the Huntington's disease mutation. *J Neurochem.* 94:639–650.

Benveniste M, Wilhelm J, Dingledine RJ, Mott DD (2010) Subunit-dependent modulation of kainate receptors by muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res.* 1352:61–69.

Bernard V, Gardiol A, Faucheux B, Bloch B, Agid Y, Hirsch EC (1996) Expression of glutamate receptors in the human and rat basal ganglia; Effect of the dopaminergic denervation on AMPA receptor gene expression in the striatopallidal complex in Parkinson's disease and rat with 6-OHDA lesion. *J Comp Neurol.* 368:553–568.

- Betarbet R, Porter RH, Greenamyre JT (2000) GluR1 glutamate receptor subunit is regulated differentially in the primate basal ganglia following nigrostriatal dopamine denervation. *J Neurochem.* 74:1166–1174.
- Betarbet R, Poisik O, Sherer TB, Greenamyre JT (2004) Differential expression and ser897 phosphorylation of striatal N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 in animal models of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 187:76–85.
- Bisaga A, Popik P (2000) In search of a new pharmacological treatment for drug and alcohol addiction; N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists. *Drug Alcohol Depend.* 59:1–15.
- Biziere K, Coyle JT (1979) Effects of cortical ablation on the neurotoxicity and receptor binding of kainic acid in striatum. *J Neurosci Res.* 4:383–398.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 62:63–88.
- Blandini F (2010) An update on the potential role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Funct Neurol.* 25:65–71.
- Blandini F, Armentero M-T, Martignoni E (2008) The 6-hydroxydopamine model; News from the past. *Parkinsonism Relat Disord.* 14 Suppl 2:124-129.
- Bonifacio MJ, Palma PN, Almeida L, Soares-da-Silva P (2007) Catechol-O-methyltransferase and its inhibitors in Parkinson's disease. *CNS Drug Rev.* 13:352–379.
- Bozkurt A (2004) In-vitro Rezeptorautoradiographie und Konnektivitätsanalysen des Gyrus cinguli bei Makaken (Dissertationsschrift). Düsseldorf: C. & O. Vogt Institut für Hirnforschung der Heinrich-Heine-Universität.
- Bozzi Y, Costantin L, Antonucci F, Caleo M (2006) Action of botulinum neurotoxins in the central nervous system; Antiepileptic effects. *Neurotox Res.* 9:197–203.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, Vos RAI de, Jansen Steur ENH, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 24:197–211.
- Byrnes KR, Loane DJ, Faden AI (2009) Metabotropic glutamate receptors as targets for multipotential treatment of neurological disorders. *Neurotherapeutics.* 6:94–107.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia; A critical reappraisal. *Nat Neurosci.* 17:1022–1030.
- Caleo M, Antonucci F, Restani L, Mazzocchio R (2009) A reappraisal of the central effects of botulinum neurotoxin type A; By what mechanism? *J Neurochem.* 109:15–24.
- Caraci F, Battaglia G, Sortino MA, Spampinato S, Molinaro G, Copani A, Nicoletti F, Bruno V (2012) Metabotropic glutamate receptors in neurodegeneration/neuroprotection; Still a hot topic? *Neurochem Int.* 61:559–565.
- Cartmell J, Schoepp DD (2000) Regulation of Neurotransmitter Release by Metabotropic Glutamate Receptors. *J Neurochem.* 75 (3):889–907.
- Cersosimo MG (2015) Gastrointestinal Biopsies for the Diagnosis of Alpha-Synuclein Pathology in Parkinson's Disease. *Gastroenterol Res Pract.*

- Cheng J, Liu W, Duffney LJ, Yan Z (2013) SNARE proteins are essential in the potentiation of NMDA receptors by group II metabotropic glutamate receptors. *J Physiol.* 591:3935–3947.
- Cho K, Francis JC, Hirbec H, Dev K, Brown MW, Henley JM, Bashir ZI (2003) Regulation of kainate receptors by protein kinase C and metabotropic glutamate receptors. *J Physiol.* 548:723–730.
- Chotibut T, Davis RW, Arnold JC, Frenckek Z, Gurwara S, Bondada V, Geddes JW, Salvatore MF (2014) Ceftriaxone increases glutamate uptake and reduces striatal tyrosine hydroxylase loss in 6-OHDA Parkinson's model. *Mol Neurobiol.* 49:1282–1292.
- Christine CW, Starr PA, Larson PS, Eberling JL, Jagust WJ, Hawkins RA, VanBrocklin HF, Wright JF, Bankiewicz KS, Aminoff MJ (2009) Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology.* 73:1662–1669.
- Conn PJ, Battaglia G, Marino MJ, Nicoletti F (2005) Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nat Rev Neurosci.* 6:787–798.
- Costantin L, Bozzi Y, Richichi C, Viegi A, Antonucci F, Funicello M, Gobbi M, Mennini T, Rossetto O, Montecucco C, Maffei L, Vezzani A, Caleo M (2005) Antiepileptic effects of botulinum neurotoxin E. *J Neurosci.* 25:1943–1951.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) L-dopa in parkinson's syndrome. *N Engl J Med.* 281 (5):272.
- Davletov B, Bajohrs M, Binz T (2005) Beyond BOTOX; Advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins. *Trends Neurosci.* 28:446–452.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13:281–285.
- Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P et al (2006) A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 355:896–908.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2016) S3-Leitlinie: Idiopathisches Parkinson-Syndrom-Langversion.
https://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2016/PDFs_Download/030010_LL_langfassung_ips_2016.pdf. Zugriffen: 16. Mai 2017.
- Di Maio V, Ventriglia F, Santillo S (2016) A model of dopamine regulation of glutamatergic synapse on medium size spiny neurons. *Biosystems.* 142-143:25–31.
- Donevan SD, Beg A, Gunther JM, Twyman RE (1998) The methylglutamate, SYM 2081, is a potent and highly selective agonist at kainate receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 285:539–545.
- Doppler K, Jentschke H-M, Schulmeyer L, Vadasz D, Janzen A, Luster M, Hoffken H, Mayer G, Brumberg J, Boon J, Musacchio T, Klebe S, Sittig-Wiegand E, Volkmann J, Sommer C, Oertel WH (2017) Dermal phospho-alpha-synuclein deposits confirm REM sleep behaviour disorder as prodromal Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 133:535–545.
- Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology.* 68:384–386.

Dressler D (2013) Botulinum toxin therapy; Its use for neurological disorders of the autonomic nervous system. *J Neurol.* 260:701–713.

Dunah AW, Wang Y, Yasuda RP, Kameyama K, Huganir 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.

Duty S, Jenner P (2011) Animal models of Parkinson's disease; A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *B J Pharmacol.* 164:1357–1391.

EHRINGER H, HORNYKIEWICZ O (1960) Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr.* 38:1236–1239.

Emson PC, Waldvogel HJ, Faull RL (2010) Chapter 4: Neurotransmitter Receptors in the Basal Ganglia. In: Heinz Steiner, Kuei Tseng, Hrsg. *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function.* Elsevier, 75-96.

Errami M, Nieoullon A (1988) alpha-[3H]Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid binding to rat striatal membranes: effects of selective brain lesions. *J Neurochem.* 51 (2):579–586.

Florentini C, Rizzetti MC, Busi C, Bontempi S, Collo G, Spano P, Missale C (2006) Loss of synaptic D1 dopamine/N-methyl-D-aspartate glutamate receptor complexes in L-DOPA-induced dyskinesia in the rat. *Mol Pharmacol.* 69:805–812.

Gan J, Qi C, Mao L-M, Liu Z (2014) Changes in surface expression of N-methyl-D-aspartate receptors in the striatum in a rat model of Parkinson's disease. *Drug Des Devel Ther.* 8:165–173.

Gardoni F, Di Luca M (2015) Targeting glutamatergic synapses in Parkinson's disease. *Curr Opin Pharmacol.* 20:24–28.

Greenamyre JT, Young AB (1989) Synaptic localization of striatal NMDA, quisqualate and kainate receptors. *Neurosci Lett.* 101:133–137.

Holemans S, Javoy F, Agid Y, Laterre EC, Maloteaux JM (1991) 3HMK-801 binding to NMDA glutamatergic receptors in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Brain Res.* 565:154–157.

Holzmann C, Dräger D, Mix E, Hawlitschka A, Antipova V, Benecke R, Wree A (2012) Effects of intrastriatal botulinum neurotoxin A on the behavior of Wistar rats. *Behav Brain Res.* 234:107–116.

Horstink M, Tolosa E, Bonuccelli U, Deuschl G, Friedman A, Kanovsky P, Larsen JP, Lees A, Oertel W, Poewe W, Rascol O, Sampaio C (2006) Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Movement Disorder Society-European Section. Part I; Early (uncomplicated) Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 13:1170–1185.

Huot P, Johnston TH, Koprich JB, Fox SH, Brotchie JM (2013) The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacol Rev.* 65:171–222.

Jang C-G, Park Y, Rockhold RW, Ho IK (1999) Autoradiographic study of NMDA-displaceable [3 H]glutamate and [3 H]MK-801 binding during butorphanol withdrawal in the rat brain. *Brain Res.* 845:236–241.

- Jarvis MF, Murphy DE, Williams M (1987) Quantitative autoradiographic localization of NMDA receptors in rat brain using [3H]CPP: comparison with [3H]TCP binding sites. *Eur J Pharmacol.* 141:149–152.
- Jin S, Yang J, Lee WL, Wong PT (2000) Crucial role of kainate receptors in mediating striatal kainate injection-induced decrease in acetylcholine M(1) receptor binding in rat forebrain. *Brain Res.* 882:128–138.
- Jin X-T, Paré J-F, Raju DV, Smith Y (2006) Localization and function of pre- and postsynaptic kainate receptors in the rat globus pallidus. *Eur J Neurosci.* 23:374–386.
- Kito S, Miyoshi R, Nomoto T (1990) Influence of age on NMDA receptor complex in rat brain studied by in vitro autoradiography. *J Histochem Cytochem.* 38:1725–1731.
- Kobylecki C, Crossman AR, Ravenscroft P (2013) Alternative splicing of AMPA receptor subunits in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. *Exp Neurol.* 247:476–484.
- Lai SK, Tse YC, Yang MS, Wong CKC, Chan YS, Yung KKL (2003) Gene expression of glutamate receptors GluR1 and NR1 is differentially modulated in striatal neurons in rats after 6-hydroxydopamine lesion. *Neurochem Int.* 43:639–653.
- Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Grooms SY, Lin Y, Araneda RC, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS (2001) Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat Neurosci.* 4:382–390.
- Lau CG, Takayasu Y, Rodenas-Ruano A, Paternain AV, Lerma J, Bennett MVL, Zukin RS (2010) SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA receptor trafficking. *J Neurosci.* 30:242–254.
- Lerma J (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci.* 4:481–495.
- Lerma J, Marques JM (2013) Kainate receptors in health and disease. *Neuron.* 80:292–311.
- Levy R, Hazrati LN, Herrero MT, Vila M, Hassani OK, Mouroux M, Ruberg M, Asensi H, Agid Y, Feger J, Obeso JA, Parent A, Hirsch EC (1997) Re-evaluation of the functional anatomy of the basal ganglia in normal and Parkinsonian states. *Neuroscience.* 76:335–343.
- LeWitt PA, Fahn S (2016) Levodopa therapy for Parkinson disease; A look backward and forward. *Neurology.* 86:3-12.
- London ED, Coyle JT (1979) Specific binding of 3Hkainic acid to receptor sites in rat brain. *Mol Pharmacol.* 15:492–505.
- Loschmann P-A, Groote C de, Smith L, Wullner U, Fischer G, Kemp JA, Jenner P, Klockgether T (2004) Antiparkinsonian activity of Ro 25-6981, a NR2B subunit specific NMDA receptor antagonist, in animal models of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 187:86–93.
- Manuel I, Barreda-Gomez G, Gonzalez de San Roman E, Veloso A, Fernandez JA, Giralt MT, Rodriguez-Puertas R (2015) Neurotransmitter receptor localization; From autoradiography to imaging mass spectrometry. *ACS Chem Neurosci.* 6:362–373.

- Marino MJ, Rouse ST, Levey AI, Potter LT, Conn PJ (1998) Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:11465–11470.
- Matak I, Lackovic Z (2014) Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol*. 119-120:39–59.
- McDowell K, Chesselet M-F (2012) Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 46:597–606.
- McKinney M, Raddatz R (2006) Chapter 1, Unit 1.3 Practical aspects of radioligand binding. In: S.J. Enna, Michael Williams, Hrsg. *Current Protocols in Pharmacology*. Wiley and Sons Inc.
- Mehlan J, Brosig H, Schmitt O, Mix E, Wree A, Hawlitschka A (2016) Intrastriatal injection of botulinum neurotoxin-A is not cytotoxic in rat brain - A histological and stereological analysis. *Brain Res*. 1630:18–24.
- Mellone M, Gardoni F (2013) Modulation of NMDA receptor at the synapse; Promising therapeutic interventions in disorders of the nervous system. *Eur J Pharmacol*. 719:75–83.
- Messenger M, Dawson L, Duty S (2002) Changes in metabotropic glutamate receptor 1-8 gene expression in the rodent basal ganglia motor loop following lesion of the nigrostriatal tract. *Neuropharmacology*. 43:261–271.
- Mollerud S, Frydenvang K, Pickering DS, Kastrup JS (2017) Lessons from crystal structures of kainate receptors. *Neuropharmacology*. 112:16–28.
- Monaghan DT, Cotman CW (1982) The distribution of 3Hkainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res*. 252:91–100.
- Monaghan DT, Yao D, Cotman CW (1984) Distribution of [3H]AMPA binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography. *Brain Res*. 324:160–164.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989) The excitatory amino acid receptors; Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 29:365–402.
- Morari M, Marti M, Sbrenna S, Fuxe K, Bianchi C, Beani L (1998) Reciprocal dopamine-glutamate modulation of release in the basal ganglia. *Neurochem Int*. 33:383–397.
- Naumann M, Dressler D, Hallett M, Jankovic J, Schiavo G, Segal KR, Truong D (2013) Evidence-based review and assessment of botulinum neurotoxin for the treatment of secretory disorders. *Toxicon*. 67:141–152.
- Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, Wroblewski JT, Pin JP (2011) Metabotropic glutamate receptors; From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology*. 60:1017–1041.
- Nicolle MM, Bizon JL, Gallagher M (1996) In vitro autoradiography of ionotropic glutamate receptors in hippocampus and striatum of aged Long-Evans rats; Relationship to spatial learning. *Neuroscience*. 74:741–756.
- Nutt JG, Woodward WR, Ganther ST, Merrick D (1987) 3-O-methyldopa and the response to levodopa in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 21:584–588.

- Obeso JA, Marin C, Rodriguez-Oroz C, Blesa J, Benitez-Temino B, Mena-Segovia J, Rodriguez M, Olanow CW (2008) The basal ganglia in Parkinson's disease; Current concepts and unexplained observations. *Ann Neurol.* 64 Suppl 2:30-46.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AHV, Halliday G (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med.* 16:653–661.
- Oertel WH (2017) Recent advances in treating Parkinson's disease. *F1000Res.* 6:260.
- Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1993) Distribution of the messenger RNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat. *Neuroscience.* 53:1009–1018.
- Olanow CW, Prusiner SB (2009) Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:12571–12572.
- Olney JW (1995) Chapter 26: Glutamate Receptor-Mediated Neurotoxicity. In: Louis W. Chang, Hrsg. *Neurotoxicology: Approaches and Methods.* Academic Press, 455-463.
- Ossowska K, Konieczny J, Wardas J, Golembiowska K, Wolfarth S, Pilc A (2002) The role of striatal metabotropic glutamate receptors in Parkinson's disease. *Amino Acids.* 23:193–198.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 54:581–618.
- Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A (1985) Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods.* 13:139–143.
- Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS, Wenthold RJ (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience.* 71:949–976.
- Phillips T, Rees S, Augood S, Waldvogel H, Faull R, Svendsen C, Emson P (2000) Localization of metabotropic glutamate receptor type 2 in the human brain. *Neuroscience.* 95:1139–1156.
- Picconi B, Pisani A, Centonze D, Battaglia G, Storto M, Nicoletti F, Bernardi G, Calabresi P (2002) Striatal metabotropic glutamate receptor function following experimental parkinsonism and chronic levodopa treatment. *Brain.* 125:2635–2645.
- Pin JP, Comps-Agrar L, Maurel D, Monnier C, Rives ML, Trinquet E, Kniazeff J, Rondard P, Prezeau L (2009) G-protein-coupled receptor oligomers; Two or more for what? Lessons from mGlu and GABAB receptors. *J Physiol.* 587:5337–5344.
- Pin JP, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors; Structure and functions. *Neuropharmacology.* 34:1–26.
- Pisani A, Bernardi G, Ding J, Surmeier DJ (2007) Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci.* 30:545–553.
- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag A-E, Lang AE (2017) Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 3:17013.
- Porter RH, Greene JG, Higgins DS, JR, Greenamyre JT (1994) Polysynaptic regulation of glutamate receptors and mitochondrial enzyme activities in the basal ganglia of rats with unilateral dopamine depletion. *J Neurosci.* 14:7192–7199.

Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G (2015) MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 30:1591–1601.

Rainbow TC, Biegon A, Bleisch WV (1982a) Minireview; Quantitative autoradiography of neurochemicals. *Life Sci.* 30:1769–1774.

Rainbow TC, Bleisch WV, Biegon A, McEwen BS (1982b) Quantitative densitometry of neurotransmitter receptors. *J Neurosci Methods.* 5:127–138.

Rainbow TC, Wieczorek CM, Halpain S (1984) Quantitative autoradiography of binding sites for 3HAMPA, a structural analogue of glutamic acid. *Brain Res.* 309:173–177.

Restani L, Antonucci F, Gianfranceschi L, Rossi C, Rossetto O, Caleo M (2011) Evidence for anterograde transport and transcytosis of botulinum neurotoxin A (BoNT/A). *J Neurosci.* 31:15650–15659.

Richards G, Messer J, Malherbe P, Pink R, Brockhaus M, Stadler H, Wichmann J, Schaffhauser H, Mutel V (2005) Distribution and abundance of metabotropic glutamate receptor subtype 2 in rat brain revealed by 3HLY354740 binding in vitro and quantitative radioautography; Correlation with the sites of synthesis, expression, and agonist stimulation of 35SGTPgammas binding. *J Comp Neurol.* 487:15–27.

Rodriguez-Puertas R, Herrera-Marschitz M, Koistinaho J, Hokfelt 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.

Sakurai SY, Cha J-H, Penney JB, Young AB (1991) Regional distribution and properties of [3H]MK-801 binding sites determined by quantitative autoradiography in rat brain. *Neuroscience.* 40:533–543.

Samuel D, Errami M, Nieoullon A (1990) Localization of N-methyl-D-aspartate receptors in the rat striatum; Effects of specific lesions on the 3H3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid binding. *J Neurochem.* 54:1926–1933.

Schaffhauser H, Richards JG, Cartmell J, Chaboz S, Kemp JA, Klingelschmidt A, Messer J, Stadler H, Woltering T, Mutel V (1998) In vitro binding characteristics of a new selective group II metabotropic glutamate receptor radioligand, 3HLY354740, in rat brain. *Mol Pharmacol.* 53:228–233.

Schulz JB, Gerlach M, Gille G, Kuhn W, Mungersdorf M, Riederer P, Sudmeyer M, Ludolph A (2011) Basic science in Parkinson's disease; Its impact on clinical practice. *J Neurol.* 258:299–306.

Selak S, Paternain AV, Aller MI, Pico E, Rivera R, Lerma J (2009) A role for SNAP25 in internalization of kainate receptors and synaptic plasticity. *Neuron.* 63:357–371.

Senkowska A, Ossowska K (2003) Role of metabotropic glutamate receptors in animal models of Parkinson's disease. *Pol J Pharmacol.* 55:935–950.

Sgambato-Faure V, Cenci MA (2012) Glutamatergic mechanisms in the dyskinesias induced by pharmacological dopamine replacement and deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 96:69–86.

Smith Y, Wichmann T, Factor SA, DeLong MR (2012) Parkinson's disease therapeutics; New developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology*. 37:213–246.

Sovago J, Dupuis DS, Gulyas B, Hall H (2001) An overview on functional receptor autoradiography using 35SGTPgammaS. *Brain Res*. 38:149–164.

Subramaniam S, McGonigle P (1991) Quantitative Autoradiographic Characterization of the Binding of (+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cyclohepten-5,10-imine ([3H]MK-801) in Rat Brain: Regional Effects of Polyamines. *J Pharmacol Exp Ther*. 2:811–819.

Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Schumacker PT (2011) The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 198:221–231.

Surmeier DJ, Sulzer D (2013) The pathology roadmap in Parkinson disease. *Prion*. 7:85–91.

Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*. 30:228–235.

Tallaksen-Greene SJ, Wiley RG, Albin RL (1992) Localization of striatal excitatory amino acid binding site subtypes to striatonigral projection neurons. *Brain Res*. 594:165–170.

Tarazi FI, Campbell A, Baldessarini RJ (1998a) Effects of hippocampal lesions on striatolimbic ionotropic glutamatergic receptors. *Neurosci Lett*. 250:13–16.

Tarazi FI, Campbell A, Yeghiayan SK, Baldessarini RJ (1998b) Localization of Ionotropic Glutamate Receptors in Caudate-Putamen and Nucleus Accumbens Septi of Rat Brain: Comparison of NMDA, AMPA, and Kainate Receptors. *Synapse*. 30:227–235.

Tarazi FI, Zhang K, Baldessarini RJ (2000) Effects of nigrostriatal dopamine denervation on ionotropic glutamate receptors in rat caudate-putamen. *Brain Res*. 881:69–72.

Testa CM, Standaert DG, Young AB, Penney JB, JR (1994) Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the basal ganglia of the rat. *J Neurosci*. 14:3005–3018.

Testa CM, Friberg IK, Weiss SW, Standaert DG (1998) Immunohistochemical Localization of Metabotropic Glutamate Receptors mGluR1a and mGluR2/3 in the Rat Basal Ganglia. *J Comp Neurol*. 390:5–19.

Thenganatt MA, Fahn S (2012) Botulinum toxin for the treatment of movement disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 12:399–409.

Thyssen A, Hirnet D, Wolburg H, Schmalzing G, Deitmer JW, Lohr C (2010) Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular coupling via glial calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:15258–15263.

Tremblay M, Salin P, Soghomonian JJ (1995) Effect of 6-OHDA lesions on striatal mRNA levels encoding for glutamate receptor subunits. *Neuroreport*. 6:2225–2229.

Ulas J, Weihmuller FB, Brunner LC, Joyce JN, Marshall JF, Cotman CW (1994) Selective increase of NMDA-sensitive glutamate binding in the striatum of Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and mixed Parkinson's disease/Alzheimer's disease patients; An autoradiographic study. *J Neurosci*. 14:6317–6324.

Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 5:107–110.

Unnerstall JR, Wamsley JK (1983) Autoradiographic localization of high-affinity 3Hkainic acid binding sites in the rat forebrain. *Eur J Pharmacol.* 86:361–371.

Unnerstall JR, Niehoff DL, Kuhar MJ, Palacios JM (1982) Quantitative receptor autoradiography using 3Hultrofilm; Application to multiple benzodiazepine receptors. *J Neurosci Methods.* 6:59–73.

Verderio C, Grumelli C, Raiteri L, Coco S, Paluzzi S, Caccin P, Rossetto O, Bonanno G, Montecucco C, Matteoli M (2007) Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons. *Traffic.* 8:142–153.

Virmani T, Tazan S, Mazzoni P, Ford B, Greene PE (2016) Motor fluctuations due to interaction between dietary protein and levodopa in Parkinson's disease. *J Clin Mov Disord.* 3:8.

Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY (2005) Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 31:3–16.

Wang Q, Li J, Wei X, Liao J, Xu Y, Lu T, Qin B, Xie J, Deng C, Huang X (2014) Alterations of NMDA receptor binding in various brain regions among 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats. *Int J Neurosci.* 124:457–465.

Wenk GL, Barnes CA (2000) Regional changes in the hippocampal density of AMPA and NMDA receptors across the lifespan of the rat. *Brain Res.* 885:1–5.

Wheeler D, Boutelle MG, Fillenz M (1995) The role of N-methyl-D-aspartate receptors in the regulation of physiologically released dopamine. *Neuroscience.* 65:767–774.

Wisden W, Seeburg PH, Monyer H (2000) Chapter IV: AMPA, Kainate and NMDA ionotropic glutamate receptor expression—an in situ hybridization atlas. In: O.P. Ottersen, J. Strom-Mathisen, Hrsg. *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Volume 18: Glutamate.* Elsevier, 99-143.

Wong TP, Howland JG, Wang YT (2009) *NMDA Receptors and Disease*+C464. Elsevier Ltd.:1177–1182.

Wree A, Mix E, Hawlitschka A, Antipova V, Witt M, Schmitt O, Benecke R (2011) Intrastriatal botulinum toxin abolishes pathologic rotational behaviour and induces axonal varicosities in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 41:291–298.

Wree A, Schmitt O (2015) Basal Ganglia. In: Arthur W. Toga, Hrsg. *Brain Mapping, Volume 2: Anatomy and Physiology, Systems.* Elsevier, 217-227.

Wright RA, Arnold MB, Wheeler WJ, Ornstein PL, Schoepp DD (2001) 3HLY341495 binding to group II metabotropic glutamate receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 298:453–460.

Wüllner U, Testa CM, Catania MV, Young AB, Penney JB, JR (1994) Glutamate receptors in striatum and substantia nigra; Effects of medial forebrain bundle lesions. *Brain Res.* 645:98–102.

Xilouri M, Vogiatzi T, Vekrellis K, Park D, Stefanis L (2009) Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS One.* 4:e5515.

- Xue B, Chen EC, He N, Jin D-Z, Mao L-M, Wang JQ (2017) Integrated regulation of AMPA glutamate receptor phosphorylation in the striatum by dopamine and acetylcholine. *Neuropharmacology*. 112:57–65.
- Yan J, Xu Y, Zhu C, Zhang L, Wu A, Yang Y, Xiong Z, Deng C, Huang X-F, Yenari MA, Yang Y-G, Ying W, Wang Q (2011) Simvastatin prevents dopaminergic neurodegeneration in experimental parkinsonian models; The association with anti-inflammatory responses. *PLoS One*. 6:e20945.
- Young WS3, Kuhar MJ (1979) A new method for receptor autoradiography; 3Hopioid receptors in rat brain. *Brain Res*. 179:255–270.
- Zamponi GW (2003) Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. *J Pharmacol Sci*. 92:79–83.
- Zavitsanou K, Mitsacos A, Giompres P, Kouvelas ED (1996) Changes in [3H]AMPA and [3H]kainate binding in rat caudate-putamen and nucleus accumbens after 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle: an autoradiographic study. *Brain Res*. 731:132–140.
- Zhou LM, Gu ZQ, Costa AM, Yamada KA, Mansson PE, Giordano T, Skolnick P, Jones KA (1997) (2S,4R)-4-methylglutamic acid (SYM 2081); A selective, high-affinity ligand for kainate receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 280:422–427.
- Zilles K, Schleicher A, Rath M, Glaser T, Traber J (1986) Quantitative autoradiography of transmitter binding sites with an image analyzer. *J Neurosci Methods*. 18:207–220.
- Zilles K, Schleicher A, Rath M, Bauer A (1988) Quantitative receptor autoradiography in the human brain; Methodical aspects. *Histochemistry*. 90:129–137.
- Zilles K, Qü MS, Schröder H, Schleicher A (1991a) Neurotransmitter receptors and cortical architecture. *J Hirnforsch*. 32:343–356.
- Zilles K, Werner L, Qü M, Schleicher A, Gross G (1991b) Quantitative autoradiography of 11 different transmitter binding sites in the basal forebrain region of the rat—evidence of heterogeneity in distribution patterns. *Neuroscience*. 42:473–481.
- Zilles K, Palomero-Gallagher N, Grefkes C, Scheperjans F, Boy C, Amunts K, Schleicher A (2002) Architectonics of the human cerebral cortex and transmitter receptor fingerprints; Reconciling functional neuroanatomy and neurochemistry. *Eur Neuropsychopharmacol*. 12:587–599.
- Zilles K, Palomero-Gallagher N, Schleicher A (2004) Transmitter receptors and functional anatomy of the cerebral cortex. *J Anat*. 205:417–432.
- Ztaou S, Maurice N, Camon J, Guiraudie-Capraz G, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C, Liberge M, Amalric M (2016) Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M1 and M4 Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *J Neurosci*. 36:9161–9172.

Anhang

Tabelle 5: Tierplan der fünf Versuchsgruppen

Gruppe	Verfahren	Tötungszeitpunkt	Anzahl der Tiere
L	6-OHDA		
		nach 3 Wochen (L3W)	7
		nach 6 Wochen (L6W)	7
		nach 6 Wochen + 1 Monat (L6W1M)	7
		nach 6 Wochen + 3 Monate (L6W3M)	7
		nach 6 Wochen + 6 Monate (L6W6M)	7
		nach 6 Wochen + 9 Monate (L6W9M)	6
LB	6-OHDA + BoNT/A (1ng 6 Wochen n. 6-OHDA)		
		nach 6 Wochen + 1 Monat (LB6W1M)	9
		nach 6 Wochen + 3 Monate (LB6W3M)	9
		nach 6 Wochen + 6 Monate (LB6W6M)	8
		nach 6 Wochen + 9 Monate (LB6W9M)	8
LV	6-OHDA + Plazebo (6 Wochen n. 6-OHDA)		
		nach 6 Wochen + 1 Monat (LV6W1M)	6
		nach 6 Wochen + 3 Monate (LV6W3M)	6
B	BoNT/A (1ng)		
		nach 2 Wochen (B2W)	7
		nach 1 Monat (B1M)	6
		nach 3 Monaten (B3M)	6
		nach 6 Monaten (B6M)	7
		nach 9 Monaten (B9M)	7
K	unbehandelte Kontrolle	nach 6 Wochen (K)	7

Tabelle 6: Rezeptor-spezifische Inkubationsbedingungen

AMPA Rezeptoren	Puffer	Zeit	Temperatur
Vorinkubation	50 mM Tris-Citrat (pH: 7,2)	3 x 10 min	4° C
Hauptinkubation	50 mM Tris-Citrat (pH: 7,2) + 100 nM KSCN 10 nM [³ H]AMPA (Agonist) 10 µM Quisqualat (Kompetitor)	45 min	4° C
Waschen	50 mM Tris-Citrat (pH: 7,2)	4 x 4 sec	4° C
Waschen	2,5% Glutaraldehyd in Aceton	2 x 2 sec	Raumtemperatur
Kainat Rezeptoren	Puffer	Zeit	Temperatur
Vorinkubation	50 mM Tris-Citrat (pH: 7,1)	3 x 10 min	4° C
Hauptinkubation	50 mM Tris-Citrat (pH: 7,1) + 10 mM Calciumacetat 9,4 nM [³ H]Kainat (Agonist) 100 µM SYM 2081 (Kompetitor)	45 min	4° C
Waschen	50 mM Tris-Citrat (pH: 7,1)	3 x 4 sec	4° C
Waschen	2,5% Glutaraldehyd in Aceton	2 x 2 sec	Raumtemperatur
NMDA Rezeptoren	Puffer	Zeit	Temperatur
Vorinkubation	50 mM Tris-HCL (pH: 7,2)	15 min	4° C
Hauptinkubation	50 mM Tris-HCL (pH: 7,2) + 50 µM Glutamat + 30 µM Glycin + 50 µM Spermidin 3.3 nM [³ H]MK 801 (Agonist) 100 µM MK 801 (Kompetitor)	60 min	Raumtemperatur
Waschen	50 mM Tris-HCL (pH: 7,2) + 50 µM Glutamat	2 x 5 min	4° C
Waschen	Destilliertes Wasser	1 x Dippen	4° C

mGlu2/3-Rezeptoren	Puffer	Zeit	Temperatur
Vorinkubation	10 mM Phosphat Puffer (pH: 7,6)	2 x 5 min	Raumtemperatur
Hauptinkubation	10 mM Phosphat Puffer (pH: 7,6) + 100 mM Kaliumbromid 1 nM [³ H]LY 341,495 (Agonist) 1 mM L-Glutamat	60 min	4° C
Waschen	10 mM Phosphat Puffer (pH: 7,6)	2 x 5 min	4° C
Waschen	Destilliertes Wasser	1 x Dippen	4° C

Tabelle 7: Expositionszeiten der verschiedenen Liganden

[³ H]Kainat	12 Wochen
[³ H]MK 801	12 Wochen
[³ H]LY 341,495	10 Wochen
[³ H]AMPA	15 Wochen

Tabelle 8: Liganden-spezifische Konstanten

Ligand	Abk.	Spezifische Aktivität (Ci/mmol) = SA	Dissoziations- konstante (nM) = Kd	Real- konzentration (nM) = L	Rezeptor
AMPA	ampa	45,8	10	10,17	AMPA
KAINAT	kain	49,9	9,4	9,54	KAINAT
MK 801	mk801	22,5	3,3	3,3	NMDA
LY 341,459	ly34	40	1	1,01	mGlu2/3

AMPA**Normales Striatum der Ratte**

Bauer et al. 2005: Regional and subtype selective changes of neurotransmitter receptor density in a rat transgenic for the Huntington's disease mutation

Rezeptordichte Caudatus-Putamen Komplex Kontrollgruppe

1469 (107) fmol/mg Protein (SD)

Ligand: 10 nmol/L [³H]AMPA

Kompetitor: 10 µM/L Quisqualat

Puffer: 50 mM/L Tris-HCL, 100 mM/L KSCN

Albin et al. 1992: Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study

Rezeptordichte laterales/mediales/dorsales Striatum

2,417(0,031)/2,559(0,082)/2,287(0,105) pmol/mg Protein (SEM)

Ligand: 34 nM [³H]AMPA

Kompetitor: 1mM Glutamat

Puffer: 50mM Tris-HCL, 30 mM KSCN, 2,5 mM CaCl₂

Monaghan, 1984: Distribution of [³H]AMPA binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography

Rezeptordichte anteriores/posteriores/mediales/laterales Striatum

112(5); 82(10); 85(11); 86(4) fmol/mg Protein (SEM)

Ligand: 50 nmol [³H]AMPA

Kompetitor: 100 µM AMPA

Puffer: 50 mM Tris-Acetat

Rainbow et al 1984: Quantitative autoradiography of binding sites for [³H]AMPA, a structural analogue of glutamic acid

Rezeptordichte Nucleus Caudatus Putamen

236(27) fmol/mg Protein (SEM)

Ligand: 300 nM [³H]AMPA

Kompetitor: 1mM Glutamat

Puffer: 50 mM Tris-HCL

Striatum der Ratte nach 6-OHDA Läsion

Tarazi et al 2000: Effects of nigrostriatal dopamine denervation on ionotropic glutamate receptors in rat caudate-putamen

Rezeptordichte medialer/lateraler Caudatus-Putamen, 5 W post 6-OHDA

Ipsilateral: 342,9(18,3)/337,0(15,6) fmol/mg Gewebe (SEM)

Kontralateral: 344,5(19,9)/331,9(18,2) fmol/mg Gewebe (SEM)

Ligand: 20 nM [³H]CNQX

Kompetitor: 20 µM CNQX

Puffer: 50 mM Tris-HCL

Zavitsanou et al 1996: Changes in [³H]AMPA and [³H]kainate binding in rat caudate-putamen and nucleus accumbens after 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle: an autoradiographic study

Rezeptordichte Nucleus caudatus/Putamen, 1/4 W post 6-OHDA

Ipsilateral: 8,7(0,2) pmol/mg Protein (SEM)

Kontralateral: 11(0,3) pmol/mg Protein (SEM)

Ligand: 150 nM [³H]AMPA (Sättigungskonzentration)

Kompetitor: 1mM Glutamat

Puffer: 50 mM Tris-HCL, 2,5 mM CaCl₂, 100 mM KSCN

Porter et al 1994: Polysynaptic Regulation of Glutamate Receptors and Mitochondrial Enzyme Activities in the Basal Ganglia of Rats with Unilateral Dopamine Depletion

Rezeptordichte anteriores Striatum, 6M post 6-OHDA

Ipsilateral: 167,5(10,6) fmol/mg Gewebe (SEM)

Kontralateral: 175,7(12,3) fmol/mg Gewebe (SEM)

Ligand: 5 nM [³H]AMPA

Kompetitor: 1mM Glutamat

Puffer: 50 mM Tris-Chlorid, 100 mM KSCN, 2,5 mM CaCl₂

Tarazi, Campbell et al. 1998: Localization of Ionotropic Glutamate Receptors in Caudate-Putamen and Nucleus Accumbens Septi of Rat Brain: Comparison of NMDA, AMPA, and Kainate Receptors

Rezeptordichte medialer/lateraler Caudatus Putamen, 1 W post 6-OHDA

Ipsilateral: 232.6(7,5)/230.2(6,7) fmol/mg Gewebe (SEM)

Kontralateral: 261,9(8,5)/261,7(9,3) fmol/mg Gewebe (SEM)

Ligand: 20 nM [³H]CNQX

Kompetitor: 20 µM CNQX

Puffer: 50 mM Tris-HCL

Kainat

Normales Striatum der Ratte

Bauer et al. 2005: Regional and subtype selective changes of neurotransmitter receptor density in a rat transgenic for the Huntington's disease mutation

Rezeptordichte Caudatus-Putamen Komplex Kontrollgruppe

2805 (378) fmol/mg Protein (SD)

Ligand: 17 nmol/L [³H] SYM2081

Kompetitor: 100 µmol/l Kainat

Puffer: 50mmol/L Tris-citrat; pH 7,1

Albin et al. 1992: Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study

Rezeptordichte laterales/mediales/dorsales Striatum

1,044(0,172)/0,958(0,179)/0,895(0,091) pmol/mg Protein (SEM)

Ligand: 60 nM [³H]Kainat

Kompetitor: 100 µM Kainat

Puffer: 50 mM Tris-Acetat; pH 7,2

Striatum der Ratte nach 6-OHDA Läsion

Tarazi et al. 2000: Effects of nigrostriatal dopamine denervation on ionotropic glutamate receptors in rat caudate-putamen

Rezeptordichte medialer/lateraler Caudatus-Putamen, 5 W post 6-OHDA

Ipsilateral: 128(5,6)/148,4(6,7) fmol/mg Gewebe (SEM)

Kontralateral: 106,5(5,5)/123,7(4,7) fmol/mg Gewebe (SEM)

Ligand: 20 nM [³H]Kainat

Kompetitor: 20 µM Kainat

Puffer: 50 mM Tris-HCL

Zavitsanou et al. 1996: Changes in [³H]AMPA and [³H]kainate binding in rat caudate-putamen and nucleus accumbens after 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle: an autoradiographic study

Rezeptordichte Nucleus caudatus/Putamen, 1/4 W post 6-OHDA

Ipsilateral: 2,4(0,3) pmol/mg Protein (SEM)

Kontralateral: 3,2(0,3) pmol/mg Protein (SEM)

Ligand: 150 nM [³H]Kainat

Kompetitor: 50 µM Kainat

Puffer: 50 mM Tris-Citrat

Tarazi, Campbell et al. 1998: Localization of Ionotropic Glutamate Receptors in Caudate-Putamen and Nucleus Accumbens Septi of Rat Brain: Comparison of NMDA, AMPA, and Kainate Receptors

Rezeptordichte medialer/lateraler Caudatus Putamen, 1 W post 6-OHDA

Ipsilateral: 76,7(1,2)/82,0(1,3) fmol/mg Gewebe (SEM)

Kontralateral: 86,2(2,2)/92,3(2,4) fmol/mg Gewebe (SEM)

Ligand: 20 nM [³H]Kainat

Kompetitor: 25 µM Kainat

Puffer: 50 mM Tris-HCL

NMDA**Normales Striatum der Ratte**

Bauer et al. 2005: Regional and subtype selective changes of neurotransmitter receptor density in a rat transgenic for the Huntington's disease mutation

Rezeptordichte Caudatus-Putamen Komplex Kontrollgruppe

1149 (178) fmol/mg Protein (SD)

Ligand: 3,3 nmol/L [³H]MK801

Kompetitor: 100 µM /L MK801

Puffer: 50 mmol/L Tris-HCL, + 50 µmol/L Glutamat, 30 µM Glycin, 50 µM Spermidin

Jang et al. 1999: Autoradiographic study of NMDA-displaceable [³H]Glutamate and [³H]MK801 binding during butorphanol withdrawal in the rat brain

Rezeptordichte Nucleus caudatus/Putamen

179,7 (2,6) fmol/mg Gewebe (SEM)

Ligand: 10 nM [³H]MK801

Kompetitor: 50 µM MK801

Puffer: 50 mM Tris-HCL, 30 µM Glutamat, 10 µM Glycin

Albin et al. 1992: Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study

Rezeptordichten laterales/mediales/dorsales Striatum

0,673(0,016)/0,676(0,06)/0,68(0,016) pmol/mg Protein (SEM)

Ligand: 60 nM [³H] Glutamat

Kompetitor: 1 mM NMDA

Puffer: 50mM Tris-Acetat

Subramaniam et al. 1991: Quantitative Autoradiographic Characterization of the Binding of (+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cycloheptene-5,10-imine ([³H]MK-801) in Rat Brain: Regional Effects of Polyamines

Rezeptordichte Nucleus caudatus/Putamen

1028 (104) fmol/mg Protein (SE)

Ligand: 25 nM [³H]MK801

Kompetitor: 200 µM Ketamin

Puffer: 30mM N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[3-propanesulfonic acid], +100 µM Glutamat, 100 µM Glycin, 1 mM EDTA

Sakurai et al. 1991: Regional distribution and properties of [³H]MK-801 binding sites determined by quantitative autoradiography in rat brain

Rezeptordichte medialer/lateraler/anteriorer/posteriorer Caudatus Putamen

0,284 (0,011)/0,227(0,017)/0,450(0,037)/0,574(0,048) pmol/mg Protein (SEM)

Ligand: 5 nM [³H]MK801

Kompetitor: 5 µM MK801

Puffer: 50 mM Tris-Acetat; pH 7,4

Jarvis et al. 1987: Quantitative autoradiographic localization of NMDA receptors in rat brain using [³H]CPP: comparison with [³H]TCP binding sites

Rezeptordichte Striatum

57 (10) fmol/mg Gewebe (SEM)

Ligand: 50 nM [³H]CPP

Kompetitor: 1 mM L-Glutamat

Puffer: 50 mM Tris-HCL; pH 7,6

6 (2) fmol/mg Gewebe (SEM)

Ligand: 20 nM [³H]TCP

Kompetitor: 25 µM PCP

Puffer: 50 mM Tris-Acetat, 1 mM MgCl₂

Striatum der Ratte nach 6-OHDA Läsion

Tarazi et al. 2000: Effects of nigrostriatal dopamine denervation on ionotropic glutamate receptors in rat caudate-putamen

Rezeptordichte medialer/lateraler Caudatus-Putamen, 5 Wochen nach 6-OHDA

Ipsilateral: 163,3(6)/171,4(5,2) fmol/mg Gewebe (SEM)

Kontralateral: 167,3(6,4)/176,4(5,6) fmol/mg Gewebe (SEM)

Ligand: 10 nM [³H]MK801

Kompetitor: 20 µM Ketamin

Puffer: 50 mM Tris-HCL, 100 µM Glutamat, 100 µM Glycin, 1 mM EDTA, 75 µM Spermin

Araki et al. 2000: Temporal changes of dopaminergic and glutamatergic receptors in 6-hydroxydopamine-treated rat brain

Rezeptordichte mediales/laterales Striatum, 1/2/4/8 Wochen nach 6-OHDA

Ipsilateral: 1W 201(40)/214(28) fmol/mg Gewebe (SD)

2W 213(35)/227(34) fmol/mg Gewebe (SD)

4W 204(18)/228(22) fmol/mg Gewebe (SD)

8W 210(20)/219(24) fmol/mg Gewebe (SD)

Kontralateral: 1W 209(43)/212(36) fmol/mg Gewebe (SD)

2W 231(26)/252(33) fmol/mg Gewebe (SD)

4W 229(34)/241(25) fmol/mg Gewebe (SD)

8W 209(26)/217(20) fmol/mg Gewebe (SD)

Ligand: 30 nM [³H]MK801

Kompetitor: 100 µM MK801

Puffer: 50 mM Tris-HCL

Porter et al. 1994: Polysynaptic Regulation of Glutamate Receptors and Mitochondrial Enzyme Activities in the Basal Ganglia of Rats with Unilateral Dopamine Depletion

Rezeptordichte anteriores Striatum, 6 Monate nach 6-OHDA

Ipsilateral 77,8(2,8) fmol/mg Gewebe (SEM)

Kontralateral 82,8(2,7) fmol/mg Gewebe (SEM)

Ligand: 5nM [³H]MK801

Kompetitor: 5 µM MK801

Puffer: 50 mM Tris-Acetat, 30µm Glutamat, 10µm Glycin

Tarazi, Campbell et al. 1998: Localization of Ionotropic Glutamate Receptors in Caudate-Putamen and Nucleus Accumbens Septi of Rat Brain: Comparison of NMDA, AMPA, and Kainate Receptors

Rezeptordichte medialer/lateraler Caudatus Putamen, 1W nach 6-OHDA

Ipsilateral: 101,9(3,8)/103,9(4,9) fmol/mg Gewebe (SEM)

Kontralateral: 121,8(6,2)/126,1(5,0) fmol/mg Gewebe (SEM)

Ligand: 10 nM [³H]MK801

Kompetitor: 20 µM Ketamin

Puffer: 50 mM Tris-HCL, 100 µM Glutamat, 100 µM Glycin, 1 mM EDTA, 75 µM Spermin

mGlu2/3**Normales Striatum der Ratte**

Richards et al. 2005: Distribution and abundance of metabotropic glutamate receptor subtype 2 in rat brain revealed by [³H]LY354740 binding in vitro and quantitative radioautography

Rezeptordichte Nucleus caudatus/Putamen

6 pmol/mg Protein

Ligand: 50 nM [³H]LY354740 (Agonist)

Kompetitor: 10 µM DCG-IV

Puffer: 50 mM Tris-HCL, 2mM CaCl₂, MgCl₂

Wright et al. 2001: [³H]LY341495 Binding to Group II Metabotropic Glutamate Receptors in Rat Brain

Rezeptordichte Nucleus caudatus/Putamen

1025,6 (34) fmol/mg Protein (SEM)

Ligand: 5 nM [³H]LY341495 (Antagonist)

Kompetitor: 1 mM L-Glutamat

Puffer: 10 mM Kalium-Phosphat Puffer mit 100 mM Kaliumbromid; pH 7,6

Expositionszeit: 2 Wochen

Schaffhauser et al. 1998: In Vitro Binding Characteristics of a New Selective Group II Metabotropic Glutamate Receptor Radioligand, [³H] LY354740, in Rat Brain

Rezeptordichte Nucleus caudatus/Putamen

3180 (347) fmol/mg Protein (SD)

Ligand: 50 nM [³H] LY354740 (Agonist)

Kompetitor: 10 µM DCG-IV

Puffer: 50 mM Tris-HCL, 2mM CaCl₂, MgCl₂,

Striatum der Ratte nach 6-OHDA

Picconi, 2002: Striatal metabotropic glutamate receptor function following experimental parkinsonism and chronic levodopa treatment

Rezeptordichte homogenisiertes Striatum

Ipsilateral: 2335 (323) fmol/mg Protein (SEM)

Kontralateral: 1407 (215) fmol/mg Protein (SEM)

Sham: 1043 (182) fmol/mg Protein (SEM)

Ligand: [³H]DCG IV (Agonist)

Kompetitor: 10 µM LY379268

Puffer: 50 mM Tris-HCL mit 2 mM MgCl₂, pH 7,4

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Friederike Sophie Vollmer, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Die Auswirkung einer intrastriatalen Botulinumneurotoxin-A-Injektion auf die Dichte von Glutamatrezeptoren in Hemiparkinsonratten“

selbständig, ohne die unzulässige Hilfe dritter Personen verfasst habe. Dazu habe ich keine anderen, als die in der Arbeit genannten, Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Ich versichere, dass diese Arbeit vorher weder in der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock, noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung, zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Rostock, den 07.07.2017

Friederike Vollmer

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. med. Andreas Wree**, Institutsdirektor des Instituts für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock. Einerseits für die Vergabe des Promotionsthemas, die Durchführung der Tierversuche, sowie die Betreuung meiner Arbeit. Andererseits für seine stetige Unterstützung während meines gesamten Studiums und seine engagierte Vorlesung über die Neuroanatomie des Menschen, womit er wesentlich zu meinem jetzigen Weg in die Neurologie beigetragen hat. Herzlichen Dank!

Für die Durchführung der Rezeptorautoradiographie bedanke ich mich bei Herrn **Prof. Dr. med. Dr. h.c. Karl Zilles**, JARA-Seniorprofessor am Institut für Neurowissenschaften und Medizin (INM-1) des Forschungszentrums Jülich, 52425 Jülich und an der Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik der RWTH Aachen, 52062 Aachen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Anatomischen Institutes der Universität Rostock (u.a. Frau Winzer und Frau Lehmann) und des Forschungszentrums Jülich (u.a. Frau Buller, Frau Teske-Bausch, Herr Cremer und Herr Schramm), für Ihre sorgfältige Arbeit im Rahmen der Materialherstellung.

Für die Einführung in die methodischen Grundlagen dieser Arbeit, seine stetige Unterstützung bei auftretenden Problemen während der Messungen und bei der Datenauswertung, danke ich besonders Herrn **Prof. Dr. med. Oliver Schmitt**, stellvertretender Institutsdirektor am Institut für Anatomie der Universität Rostock.

In der letzten Phase meiner Arbeit war Frau **Teresa Mann**, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Anatomischen Instituts Rostock, eine große Stütze für mich. Sie hatte jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen und hat durch Ihr großes Engagement, sowie konstruktive Kritik und Motivation an der richtigen Stelle, wesentlich zum Fortschritt meiner Arbeit beigetragen. Herzlichen Dank Teresa!