

Aus dem Institut für Anatomie
der Universitätsmedizin Rostock
Prof. Dr. med. A. Wree

**Einfluss der intrastriatalen Botulinumneurotoxin-A-Applikation
auf die Rezeptordichte im Hemi-Parkinson-Modell der Ratte**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von
Julia Isabel Findeisen, geboren am 15.11.1991 in Berlin-Steglitz
aus Rostock

Rostock, November 2020

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

Erstgutachter: Prof. Dr. med. A. Wree

Einrichtung: Institut für Anatomie, Universität Rostock

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. A. Storch

Einrichtung: Klinik für Neurologie, Universität Rostock

Drittgutachter: Prof. Dr. med. K. Amunts

Einrichtung: Cécile und Oskar Vogt-Institut für Hirnforschung, Düsseldorf

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 30.11.2020

Datum der Verteidigung: 08.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Morbus Parkinson.....	1
1.2 Basalganglien.....	2
1.2.1 Striatum.....	2
1.2.2 Globus pallidus.....	4
1.2.3 Nucleus subthalamicus	4
1.2.4 Nucleus accumbens	5
1.2.5 Substantia nigra.....	5
1.2.6 Weitere gemessene Areale.....	6
1.3 Verschaltung der Basalganglien und deren Rolle beim Morbus Parkinson.....	6
1.4 Therapie des Morbus Parkinson	8
1.5 Morbus Parkinson Tiermodell und bisherige Forschung der Arbeitsgruppe	9
1.6 Allgemeiner Überblick über Botulinumneurotoxine	10
1.6.1 Molekularer Aufbau und Wirkmechanismus.....	11
1.6.2 BoNT-A und Morbus Parkinson	13
1.7 Rezeptoren.....	13
1.7.1 Quantitative Rezeptorautoradiographie.....	14
1.7.2 Acetylcholinrezeptoren.....	15
1.7.3 Glutamat-Rezeptoren.....	16
1.7.4 Serotonin-Rezeptoren	18
1.7.5 Dopamin-Rezeptoren.....	18
1.7.6 GABA-Rezeptoren	19
1.7.7 Adenosin-Rezeptoren	21

1.7.8 Adrenozeptoren	21
1.8 Bisherige Ergebnisse und Fragestellung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Versuchstiere und stereotaktische Operationen.....	23
2.2 Narkose der Tiere.....	23
2.3 Intrastriatale Botulinumneurotoxin-Applikation	23
2.4 Tötung der Tiere und Fixierung der Gehirne	24
2.5 Herstellung der Rezeptorautoradiogramme.....	25
2.6 Auswertung der Rezeptorautoradiogramme.....	26
2.7 Ermittlung der Rezeptordichte.....	29
2.8 Statistik.....	30
3 Ergebnisse.....	31
3.1 M ₁ -Rezeptor	32
3.2 M ₂ (Antagonist)-Rezeptor	34
3.3 M ₂ (Agonist)-Rezeptor.....	36
3.4 M ₃ -Rezeptor	38
3.5 nACh-Rezeptor	40
3.6 Kainat-Rezeptor	42
3.7 NMDA-Rezeptor	44
3.8 mGlu _{2,3} -Rezeptor	46
3.9 5HT _{2A} -Rezeptor	48
3.10 D ₁ -Rezeptor	50
3.11 GABA A-Rezeptor.....	52
3.12 GABA A-Rezeptor mit Benzodiazepin-Bindungsstelle.....	54
3.13 GABA B-Rezeptor.....	56
3.14 A ₁ -Rezeptor	58
3.15 α ₁ -Rezeptor	60

3.16 α 2-Rezeptor	62
4 Diskussion.....	64
4.1 Einfluss von BoNT-A auf die Rezeptordichten.....	65
4.2 Beurteilung Tiermodell und Übertragbarkeit auf den Menschen.....	65
4.3 Lokale BoNT-A-Applikation als Therapieoption.....	67
5 Literaturverzeichnis.....	70
6 Thesen.....	76
7 Danksagung.....	77
8 Eigenständigkeitserklärung.....	78
9 Lebenslauf.....	79
10 Anhang.....	IX
10.1 Abbildungsverzeichnis.....	IX
10.2 Tabellenverzeichnis	X

Abkürzungsverzeichnis

Acetylcholin	(ACh)
Acetylcholinrezeptor	(AChR)
Adenosin-Rezeptor	(AR)
BoNT-A-behandelte native Ratten	(B)
Botulinumneurotoxin	(BoNT)
c-terminales Ende der schweren Kette	(HCC)
Catechol-O-Methyl-Transferase	(COMT)
Caudatus-Putamen Komplex	(CPu)
Cholineacetyltransferase-immunreaktiv	(ChAT-ir)
Cingulärer Kortex	(CG)
Cornu ammonis	(CA)
Diacylglycerin	(DAG)
Dissoziationskonstante	(Kd)
Dopamin	(DA)
Globus pallidus	(GP)
Globus pallidus externus	(GPe)
Globus pallidus internus	(GPi)
Glutamat-Rezeptor	(GluR)
Gyrus dentatus	(DG)
Idiopathisches Parkinson Syndrom	(IPS)
Ionotroper Glutmat-Rezeptor	(iGluR)
Metabotroper Glutamat-Rezeptor	(mGluR)
Morbus Parkinson	(MP)
Motorischer Kortex	(M)
Medium-sized spiny neuron	(MSN)
Muskarinischer Acetylcholinrezeptor	(mAChR)
n-terminales Ende der schweren Kette	(HCN)
Native Kontrollgruppe	(K)

Nikotinischer Acetylcholinrezeptor	(nAChR)
Nucleus accumbens	(AcB)
Nucleus pedunculopontinus	(PPN)
Nucleus subthalamicus	(STN)
Peripheres Nervensystem	(PNS)
Realkonzentration	(L)
Somatosensorischer Kortex	(S)
Spezifische Aktivität	(SA)
Standardabweichung	(SD)
Striatum	(STR)/ (CPu)
Substantia nigra	(SN)
Substantia nigra pars compacta	(SNc)
Substantia nigra pars reticulata	(SNr)
Thalamus	(THA)
Tuberculum olfactorium	(Tul)
Zentrales Nervensystem	(ZNS)
α 1-Adrenozeptor	(α 1R)
α 2-Adrenozeptor	(α 2R)
6-Hydroxydopamin	(6-OHDA)

Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Parkinson ist durch eine massive Bewegungsstörung gekennzeichnet, welche durch das Absterben Dopamin-produzierender Nervenzellen verursacht wird. Dopamin ist ein wichtiger Neurotransmitter des zentralen Nervensystems und hilft dabei Bewegungen zu steuern. Ein Untergang dieser Transmitter bewirkt eine pathologisch veränderte Neurotransmitter-Konzentration, die wiederum zu einer veränderten Anzahl von Neurotransmitter-Rezeptoren führt. Diese Rezeptoren stellen einen wichtigen Ansatzpunkt für die Therapie des Morbus Parkinson dar. Neben den dopaminergen Rezeptoren spielen aber auch andere, nicht dopaminerge Rezeptoren, eine Rolle. Deren genaues Zusammenspiel ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Wissenschaftlich untersucht wurde von unserer Arbeitsgruppe die Interaktion zwischen insgesamt 18 verschiedenen Neurotransmitter-Rezeptoren und dem Wirkstoff Botulinum-Neurotoxin A. Das Botulinum-Neurotoxin A soll dabei eine Therapieoption für die Behandlung der neurodegenerativen Erkrankung darstellen. In einer vorherigen Studie wurde in einem Tiermodell für Morbus Parkinson (Hemi-Parkinson-Ratten) eine intrastriatale Injektion von Botulinum-Neurotoxin A vorgenommen. Dies führte zu einer deutlichen Linderung der Symptome, insbesondere zu einer Verbesserung der Motorik. Dieser therapeutisch sichtbare Effekt wurde auch auf Rezeptorebene untersucht. Hier zeigten Vorarbeiten eine signifikante Veränderung nach einer Botulinum-Neurotoxin A-Gabe, zugunsten der bei Morbus Parkinson pathologisch veränderten Rezeptoranzahl bzw. Rezeptordichte. Dies erklärt auch die Verbesserung der Motorik der Hemi-Parkinson-Ratten. Um nun auch abzuklären inwieweit Botulinum-Neurotoxin A zu Veränderungen in gesunden Gehirnen führt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung der lokalen Gabe des Neurotoxins in das Striatum, bei nicht mit Morbus Parkinson erkrankten Ratten, auf Rezeptorebene untersucht. Diese Untersuchung erfolgte mit Hilfe einer quantitativen in vitro Rezeptorautoradiographie. Die Ergebnisse zeigten, dass intrastriatal injiziertes Botulinum-Neurotoxin A zu keiner signifikanten Änderung der Rezeptordichte der untersuchten Rezeptoren führte und bestärkt somit das therapeutische Potential von Botulinum-Neurotoxin A im Tiermodell.

1 Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

Die Erkrankung Morbus Parkinson (MP) gehört neben dem Restless-Legs-Syndrom und dem essentiellen Tremor zu den drei häufigsten Bewegungserkrankungen (Oertel et al., 2011b). Sie wurde im Jahr 1817 erstmals durch den Arzt James Parkinson in seiner Abhandlung „An Essay on the Shaking Palsy“ beschrieben (Parkinson, 2002). Es handelt sich beim MP um eine neurodegenerative Erkrankung, die sich ätiologisch in ein idiopathisches (IPS) bzw. primäres Parkinson-Syndrom und in ein symptomatisches bzw. sekundäres Parkinson-Syndrom einteilen lässt. Wird allgemein von MP gesprochen, ist meist das idiopathische Syndrom gemeint, da die eigentliche Ursache in den meisten Fällen unbekannt ist (Gerlach et al., 2003). In der Bundesrepublik Deutschland geht man von einer Gesamtzahl von ungefähr 220 000 Parkinson-Patienten aus. In den Industrieländern erkranken jährlich etwa 14/100 000 Einwohner mittleren Alters und etwa 160/100 000 Einwohner im Alter über 65 (Ascherio and Schwarzschild, 2016). Dies zeigt eine deutliche Prävalenzsteigerung des MP mit zunehmendem Alter. Aufgrund des demographischen Wandels wird es bis zum Jahr 2030 weltweit zu einer Verdopplung der Erkrankungen kommen (Dorsey et al., 2007). Das klinische Bild des MP lässt sich anhand von vier Kardinalsymptomen beschreiben. Zu diesen zählen zum einen die Bradykinese (verlangsamte Bewegungsabläufe), der Rigor (Muskelsteifheit), der Tremor (Muskelzittern) und die posturale Instabilität (Störung der aufrechten Körperhaltung) (Gerlach et al., 2003). Diese Krankheitszeichen lassen sich vor allem auf die Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra (SN) zurückführen (Oertel et al., 2011b). Das Absterben dieser dopaminergen Neurone führt zu einem pathologischen Mangel des Neurotransmitters Dopamin (DA). Durch die geringe Dopamin-Konzentration kommt es zu einer Enthemmung der cholinergen Neurone. Dies führt somit zu einer erhöhten Konzentration des exzitatorisch (erregend) wirkenden Neurotransmitters Acetylcholin. Es wird hierbei von einem sogenannten Hypercholinismus gesprochen, welcher die motorischen Symptome verstärkt. Neben den Degenerationsvorgängen in der Substantia nigra sind jedoch auch noch weitere dopaminerge und nicht dopaminerge Regionen des Gehirns betroffen, sodass sich die Symptomatik nicht nur auf das motorische System beschränkt. Häufig kommt es auch zu neuropsychiatrischen Störungen (wie Depression, Apathie und Demenz), autonomen Dysfunktionen (wie Obstipation und urogenitale Störungen) sowie zu Schlafstörungen und sensorischen Symptomen (wie z.B. die Hyposmie). Diese krankheitsimmanenten, nicht motorischen Störungen, können den motorischen

Symptomen vorausgehen und gelten somit als sogenannte präklinische, „prämotorische“ Indikatoren (Oertel et al., 2011b).

1.2 Basalganglien

Um das Krankheitsbild des Morbus Parkinson genauer zu verstehen, ist das Verständnis über die Neuroanatomie der Basalganglien und deren Zusammenspiel essentiell. Die Basalganglien stellen eine Gruppe untereinander verschalteter, subkortikal gelegener Kerne des Telencephalons, sowie eine Gruppe von funktionell assoziierten Kernen des Di- und des Mesencephalons dar. Die telencephalen Kerne erhalten motorische, okulomotorische, assoziative und limbische Informationen, verarbeiten diese und leiten sie unter Zwischenschaltung des Thalamus (THA) schleifenartig zu frontalen Kortexarealen zurück. Zu den Basalganglien zählen im engeren Sinn das Striatum (telencephal, gebildet aus Putamen und Nucleus caudatus) und der Globus pallidus (diencephal, mit internen- und externen Anteilen). Aufgrund der engen Verknüpfung zu diesen Kernen werden im weiteren Sinne auch funktionell assoziierte Kerne wie der Nucleus subthalamicus (diencephal), der Nucleus accumbens und die Substantia nigra (mesencephal) zu dieser Gruppe gezählt.

1.2.1 Striatum

Das Striatum (STR) liegt im Telencephalon unterhalb des Kortex. Es kann in einen größeren, hinteren Teil – dem dorsalen Striatum – und in einen kleineren, vorderen Teil – dem ventralen Striatum – gegliedert werden. Das ventrale Striatum (auch: Paläostriatum) zeichnet sich durch seine teilweise unterschiedliche Anatomie und Funktion aus (Wree and Schmitt, 2015). Ihm wird der ventral gelegene Nucleus accumbens (AcB) (geteilt in eine innere – und äußere Schale), eine noch ventraler liegende striatale Region, der Nucleus amygdaloideus centralis und ein Teil des Tuberculum olfactoriums (Tul) zugeordnet, während sich das dorsale Striatum (auch: Neostriatum) aus dem Nucleus caudatus (Kopf und Schweif) und dem Putamen zusammensetzt (Oertel et al., 2011b). In der frühen Embryonalentwicklung liegen Putamen und Nucleus caudatus eng beieinander. Diese werden beim Menschen während der weiteren embryonalen Entwicklung durch auf- und absteigende Nervenfasern (Capsula interna) getrennt, wobei feine Streifen grauer Substanz verbleiben. Diese entwicklungsbedingte Formation verleiht dem Striatum (deutsch: Streifenkörper) auch seinen Namen. Beim Nager bleibt dieser Vorgang aus, sodass ein anatomisch zusammenhängender, tropfenförmiger Komplex vorliegt. Dieser wird in der Literatur und in der vorliegenden Arbeit als Caudatus-Putamen Komplex (CPu) bezeichnet. Das Striatum erhält zahlreiche

Informationen aus verschiedenen Hirnregionen und gilt daher als „Haupteingangskern“ der Basalganglien. Zu den Neuronen des Striatums gehören zwei verschiedene Neuronentypen: zum einen die Projektionsneurone, deren Dendriten mit sog. „spines“ besetzt sind und zum anderen die Interneurone, die aufgrund nicht vorhandener „spines“ auch zu den „aspiny neurons“ gezählt werden. Bei den Projektionsneuronen, die ca. 95% aller striatalen Neurone des Nagers ausmachen, handelt es sich vorzugsweise um „medium-sized spiny neurons“ (MSN) (Nakano et al., 2000). Diese sind charakterisiert durch einen Perykariondurchmesser von 10-20 μm , mit 4-7 ausstrahlenden Dendriten, welche mit 10 000-15 000 dornartigen Fortsätzen („spines“) pro Neuron besetzt sind. Die MSNs enthalten den hemmenden Neurotransmitter GABA und lassen sich gemäß ihres Neuropeptidgehaltes, ihrer Rezeptorausstattung und ihres Projektionszieles unterscheiden in Enkephalin-haltige und Dopamin-D₂-Rezeptor-exprimierende Neurone, die zum externen Teil des Globus pallidus (GPe) (striato-pallidale Neurone; indirekter Weg) projizieren und in Substanz P- und Dynorphin-haltige Neurone, die bevorzugt den Dopamin-D₁-Rezeptor exprimieren und deren Zielstrukturen die Substantia nigra (pars reticulata) bzw. der interne Teil des Globus pallidus (GPi) (striato-nigrale Neurone; direkter Weg) sind (Nakano et al., 2000; Oertel et al., 2011a). Die Aufgabe dieser striatalen Projektionsneurone besteht darin, Informationen vom Kortex, Thalamus und der Substantia nigra (pars compacta) entgegenzunehmen (Oertel et al., 2011a). Die übrigen 5% der striatalen Neurone stellen die Interneurone dar, welche, wie bereits oben beschrieben, keine dornartigen Fortsätze besitzen. Bisher sind vier verschiedene Interneuronentypen bekannt, wobei drei von ihnen GABAerg und eine Gruppe cholinerg sind. Die Acetylcholin-haltigen Interneurone machen 1% der Gesamtpopulation striataler Neurone aus und werden aufgrund ihrer Zellkörpergröße mit 20-35 μm auch „large aspiny neurons“ genannt. Sie erhalten Afferenzen vom Kortex, Thalamus und den MSNs, die sie wiederum an ihren Zellkörpern und proximalen Dendriten innervieren. Des Weiteren erhalten sie starke dopaminerge Zuströme von der Substantia nigra (pars compacta) und exprimieren Dopamin-D₂-Rezeptoren. Aus diesem Grund spielen sie eine entscheidende Schlüsselrolle beim MP. Die verbleibenden kleinen bis mittelgroßen GABAergen Interneurone (Zellkörpergröße: 10-20 μm) erhalten Informationen vom Kortex, von den spezifischen und unspezifischen Kernen des Thalamus und dopaminerge Afferenzen von der Substantia nigra (pars compacta) (bei der Ratte zusätzlich auch vom GPe). Die GABA-haltigen Interneurone hemmen, wie die cholinergen-Interneurone, ebenfalls die MSNs (Wree and Schmitt, 2015).

1.2.2 Globus pallidus

Der Globus pallidus (GP) ist entwicklungsgeschichtlich dienzephaler Herkunft und durch auf- und absteigende Nervenfasern, der Capsula interna, nach lateral verlagert worden, sodass er dicht an das Putamen gedrängt wurde. Er wird durch die Lamina medullaris interna/medialis (eine intrathalamische Marklamelle) in ein inneres Segment: Globus pallidus internus (GPi) und in ein äußeres Segment: Globus pallidus externus (GPe) geteilt. Diese Nomenklatur entspricht dem Primaten und ist bei verschiedenen Spezies unterschiedlich. Beim Nagetier ist der GPi dem Nucleus entopeduncularis gleichzusetzen (Blandini et al., 2000). Der GPe der Primaten entspricht dem gesamten GP des Nagers (Smith et al., 1998). Somit meint die Bezeichnung GP in der vorliegenden Arbeit den GPe.

1.2.3 Nucleus subthalamicus

Der Nucleus subthalamicus (STN) beschreibt eine kleine linsenartige Ansammlung grauer Substanz, welche dorsal und medial zur Substantia nigra gelegen ist und dem Diencephalon angehört (Wree and Schmitt, 2015). Der Nucleus subthalamicus stellt den einzigen ausschließlich erregenden Kern der Basalganglien dar und weist im Wesentlichen glutamaterge Neurone auf (Oertel et al., 2011a). Die Neurone besitzen eine durchschnittliche Zellkörpergröße von 30-40 µm, besitzen 4-8 stark verzweigte Dendriten und ein langes, sich aufzweigendes Axon, das zum Globus pallidus internus und zur Substantia nigra (pars reticulata) projiziert (Sato et al., 2000). Eingehende Informationen (Afferenzen) erhält der Nucleus subthalamicus vom Globus pallidus externus, von motorischen Kortexarealen und von intralaminär liegenden Thalamus-Kernen (Nambu et al., 2000, 2002). Die Afferenzen und Efferenzen des Nucleus subthalamicus stellen somit eine Ähnlichkeit zu denen des Striatums dar. Dessen Projektionen sind jedoch im Gegensatz zur striatalen hemmenden Wirkung exzitatorisch und stellen damit ein Gegengewicht zu dessen Axonen dar. Neben der oben beschriebenen Hauptprojektion des Nucleus subthalamicus zum Globus pallidus internus und zur Substantia nigra (pars reticulata) innervieren auch einige wenige, individuelle Neurone des Nucleus subthalamicus den Globus pallidus externus, den Nucleus pedunculopontinus (PPN) und die Substantia nigra (pars compacta) (Wree and Schmitt, 2015).

1.2.4 Nucleus accumbens

Der Nucleus accumbens kann dem vorderen Striatum zugeordnet werden und gliedert sich zytoarchitektonisch in einen Kern und in eine Schale. Beim Menschen bildet er das Verbindungsstück zwischen dem vorderen-unteren Teil des Caput nuclei caudati und dem vorderen Teil des Putamen. Prinzipiell verfügt der Nucleus accumbens über die gleichen neuronalen Verbindungen wie das dorsale Striatum. Ein Unterschied besteht jedoch darin, dass er besonders eng mit dem limbischen System verknüpft ist und zudem Verbindungen zum präfrontalen Kortex und zur Area tegmentalis ventralis (kleine dopaminerge Zellgruppe im Mesencephalon) besitzt.

1.2.5 Substantia nigra

Die Substantia nigra (SN) befindet sich im Tegmentum des Mesencephalons und ist beim Menschen in diesem bereits makroskopisch als schwarzer Kern sichtbar. Diese sichtbare schwarze Farbe ist durch den hohen Melanin Gehalt in den Perikarya der Neurone bedingt. Mikroskopisch lässt sich die Substantia nigra in Bezug auf ihre Neurotransmitter, ihrer Verschaltungen und ihrer Funktion in eine Pars compacta (SNc), mit dicht gepackten melaninhaltigen, dopaminergen Neuronen (mit Ausnahme weniger kleiner GABAerge Neurone), und in eine Pars reticulata (SNr), ohne melaninhaltige Zellen, unterscheiden. Die SNr stellt eine rudimentäre Struktur im Menschen dar und ist funktionstechnisch dem Globus pallidus internus zuzuordnen (Oertel et al., 2011a). Somit projiziert sie ebenfalls wie der Globus pallidus internus zum Thalamus, allerdings hauptsächlich zu eher rostral gelegenen Thalamus-Kernen wie zum Nucleus ventralis anterior, Nucleus ventralis lateralis und Nucleus mediodorsalis, welche wiederum Afferenzen zum präfrontalen Kortex, zum frontalen Augenfeld und zum supplementär motorischen Augenfeld schicken. Die relativ großen (25-45 µm) multipolaren Neurone der SNc besitzen basale Dendriten innerhalb der SNc sowie sehr lange apikale Dendriten, die weit in die SNr reichen (Yelnik et al., 1987). Die SNc erhält zahlreiche Afferenzen von vielen verschiedenen Hirnarealen. So wird sie unter anderem von striatalen MSNs, vom Globus pallidus externus, vom Nucleus subthalamicus, vom Nucleus pedunculopontinus und von den dorsalen Raphekernen erreicht. Selber innerviert sie vor allem die Dopamin-D₁- und Dopamin-D₂-Rezeptor-tragenden Neurone des Striatums und zusätzlich über Axonkollaterale den Globus pallidus externus, den Nucleus subthalamicus und den Colliculus superior (Hedreen and DeLong, 1991).

1.2.6 Weitere gemessene Areale

Aufgrund der Vollständigkeit bezüglich zuvor erhobener Daten für das Projekt wurden weitere Hirnareale, wie der motorische Kortex (M) gemessen, welcher in die Basalganglienschleife mit eingebunden ist. Angrenzende kortikale Areale, außerhalb der Basalganglienschleife wurden ergänzend untersucht. Zu diesen gehören der cinguläre Kortex (CG) und der somatosensorische Kortex (S). Des Weiteren wurden Areale des Hippocampus (Teile des Cornu ammonis (CA1 und CA3) und des Gyrus dentatus (DG)) rezeptorautoradiographisch gemessen.

1.3 Verschaltung der Basalganglien und deren Rolle beim Morbus Parkinson

Bei der Verschaltung der Basalganglien handelt es sich um polysynaptische Schleifen, die mit dem Kortex in Kontakt stehen. Daher spricht man auch von so genannten Basalganglienschleifen. Die Hauptschleife (auch als direkter Weg der Basalganglienschleife bezeichnet) beinhaltet das Striatum, den Globus pallidus internus und die Nuclei ventrales anteriores und laterales des Thalamus. Die Nebenschleifen (auch als indirekter Weg bezeichnet) dienen der Modulation des Informationsflusses des direkten Weges. Zur Vereinfachung werden in der folgenden Beschreibung der Basalganglienverschaltung die beteiligten neuronalen Strukturen abgekürzt (Abbildung 1):

Das Striatum erhält, als Eingangskern, erregende Afferenzen aus allen Kortexarealen. Die striatalen MSNs projizieren dann über den direkten Weg hemmend zum GPi/SNr und indirekt über eine „Zwischenstation“ im GPe und dem STN polysynaptisch ebenfalls zum GPi/SNr (Albin et al., 1989; Baev et al., 2002; Kravitz et al., 2012). Vom GPi und der SNr zieht direkt eine hemmende Projektion zum THA (Nuclei ventrales anteriores und laterales), welcher erregende Fasern zum prämotorischen und supplementär motorischen Kortex schickt. Die Projektionen des direkten Weges sind letztlich demnach motorikfördernd (Striatum hemmt GPi, GPi hemmt vermindert THA, THA aktiviert vermehrt den Kortex), wohingegen die Projektionen des indirekten Weges eine Hemmung der motorischen Aktivität bewirken (Striatum hemmt GPe, GPe hemmt vermindert STN, STN aktiviert vermehrt GPi, GPi hemmt vermehrt THA, THA aktiviert vermindert den Kortex). Die Aktivität des motorischen Kortex wird also durch Hemmung (Inhibition) und Enthemmung (Disinhibition) der motorischen Kerne des THA gesteuert, was vor allem bei der Bewegungsplanung und Bewegungsinitiierung eine große Rolle spielt. Die SNc kann mit ihren dopaminergen Neuronen und durch dessen Projektionen den Informationsfluss des direkten- und indirekten Weges modifizieren. Sie hemmen über D₂-Rezeptoren den motorikhemmenden Teil des

Striatums und fördern über D₁-Rezeptoren den motorikfördernden Teil des Striatums. Dies bedeutet, dass diese Verschaltung letztlich einen erregenden Einfluss auf die Motorik hat.

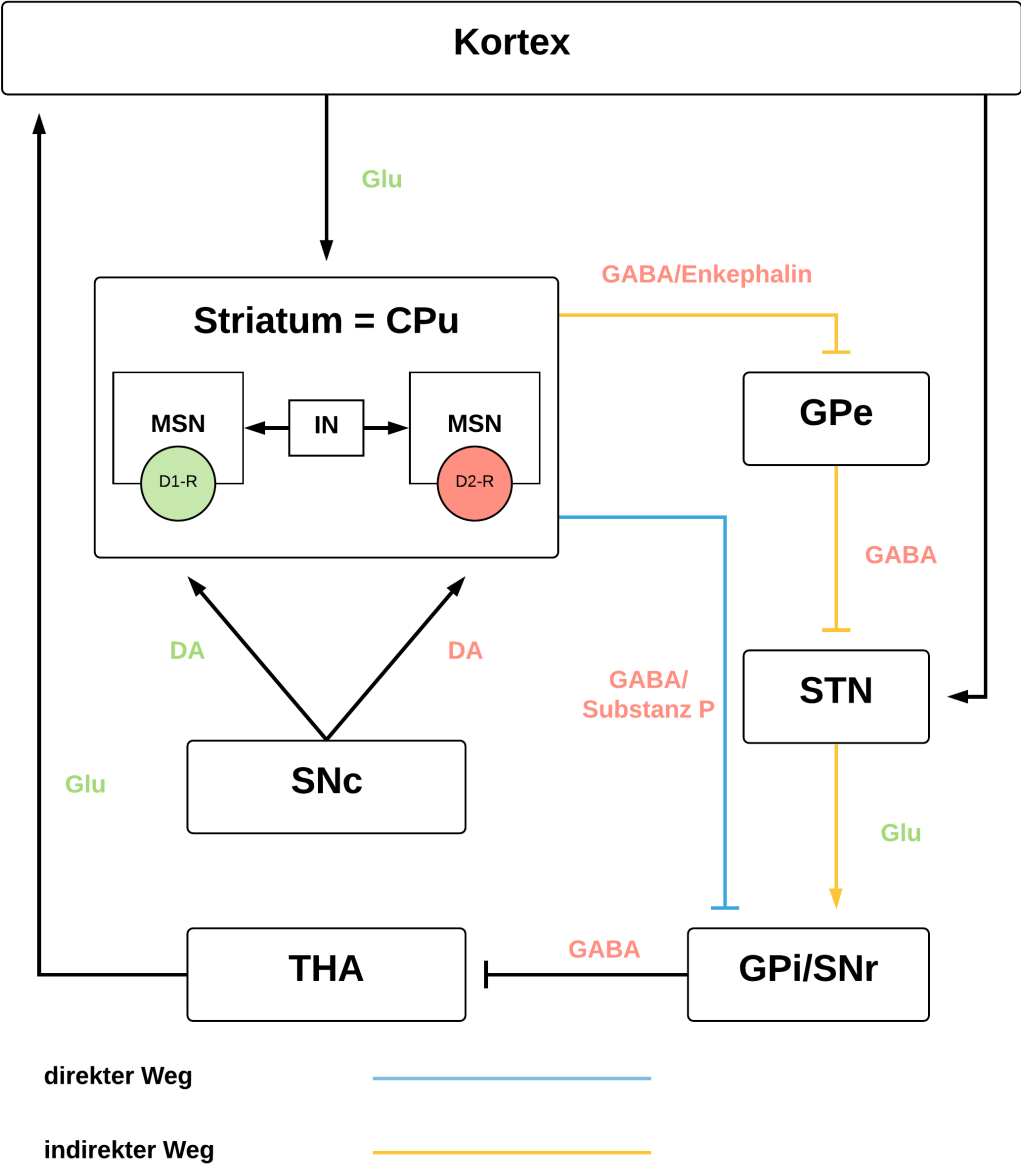


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Basalganglien und deren Verschaltung. Dargestellt sind der direkte, motorikfördernde Weg (blau) und der indirekte motorikhemmende Weg (gelb). Aktivierende Verbindungen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet, inhibierende Verbindungen sind mit einem Strich gekennzeichnet. Exzitatorisch wirkende Transmitter sind in grüner Schriftfarbe hinterlegt, inhibitorische Transmitter sind in roter Schriftfarbe hinterlegt. Abkürzungen: MSN: medium-sized spiny neuron IN = cholinerges Interneurone, SNc = Substantia nigra pars compacta, SNr = Substantia nigra pars reticulata, GPi = Globus pallidus internus, GPe = Globus pallidus externus, STN = Nucleus subthalamicus, THA = Thalamus, D₁=D₁-Rezeptor, D₂=D₂-Rezeptor, DA=Dopamin, Glu=Glutamat, GABA= γ-Aminobuttersäure

Beim MP ist die eben beschriebene Verschaltung gestört. Durch den Untergang der dopaminergen Neurone kommt es zur verminderten Aktivierung des motorikfördernden Teils des Striatums (die hemmende Wirkung des GPi ist verstärkt) und zu einer verminderten Hemmung des motorikhemmenden Teils des Striatums (inhibitorische Wirkung des GPi ist verstärkt). Insgesamt wird über diese beiden Wege die inhibitorische Wirkung des GPi auf den THA erhöht und die motorikfördernde Funktion des THA auf den Kortex reduziert. Dies führt schlussendlich zu einem der Kardinalsymptome (Bradykinese) des MPs. Darüber hinaus treten die weiteren Kardinalsymptome durch eine Aktivitätssteigerung von cholinergen Interneuronen, verursacht durch die Reduktion der dopaminergen Projektion zum Striatum, wie der Ruhetremor und der Rigor auf (Deng et al., 2007).

1.4 Therapie des Morbus Parkinson

Eine ursächliche Behandlung des MP ist bislang nicht möglich. Daher stellen die zur Verfügung stehenden Therapien der Erkrankung eine rein symptomatische Behandlung dar. Zu den herkömmlichen Verfahren gehört zum einen die Pharmakotherapie. Hierzu zählt die Behandlung mit L-2,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) – ein Vorstufenmolekül von Dopamin – (Carlsson et al., 1957; Volpato et al., 2016), Dopaminagonisten, Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT)-Hemmern, MAO-B-Hemmern, NMDA-Antagonisten oder Anticholinergika (Horstink et al., 2006a, 2006b). Zum anderen finden besonders in den Spätstadien der Erkrankung auch neurochirurgische Verfahren, wie beispielsweise die tiefe Hirnstimulation, eine Anwendung. Die Lebensqualität der Patienten kann zusätzlich durch nicht-pharmakologische Verfahren verbessert werden. Hier stehen zum Beispiel Physiotherapie, Logopädie und psychologische Therapien zur Verfügung (Bloem et al., 2015).

Da die Bevölkerung aufgrund des demografischen Wandels immer älter wird und die Anzahl der Erkrankten mit dem Alter stets zunimmt, gilt es weiterhin verstärkt daran zu arbeiten den MP bestmöglich zu therapieren. Aus diesem Grund hat sich unsere Arbeitsgruppe umfassend mit der Therapieoption des Botulinum-Neurotoxins A (BoNT-A) befasst, das eine anticholinerge Wirkung hat und dem bei Morbus Parkinson entstehenden Hypercholinismus entgegenwirken soll.

1.5 Morbus Parkinson Tiermodell und bisherige Forschung der Arbeitsgruppe

Um die Therapiemöglichkeit mittels BoNT-A genauer zu untersuchen, wurde ein etabliertes Tiermodell für MP verwendet. Da ein spontanes Auftreten des MP in der Tierwelt nicht existiert, wird die Erkrankung bei Nagetieren mit Hilfe einer neurotoxischen Manipulation erzeugt. Hierfür wird Ratten das katecholaminerge Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) injiziert. Die Injektion erfolgt einseitig (unilateral) in das mediale Vorderhirnbündel der rechten Hirnhälfte (Hemisphäre). Aus diesem Grund wird auch von sogenannten Hemi-Parkinson-Ratten gesprochen. Die Injektion in das mediale Vorderhirnbündel bewirkt ein Absterben der dopaminergen Neurone. Dies hat ein signifikantes Absinken der Dopamin-Konzentration im gleichseitigen (ipsilateralen) Striatum zur Folge. Daraus resultiert eine Enthemmung cholinergischer Neurone und somit ein starker Anstieg der Konzentration des Neurotransmitters Acetylcholin im Striatum. Dieser Konzentrationsanstieg wird als Hypercholinismus bezeichnet. Das Hemi-Parkinson-Modell der Ratte weist somit die Pathologie des MP auf und eignet sich daher sehr gut für unsere Studien. Aufgrund dessen, dass die Erkrankung durch die Injektion nur unilateral in einer Hemisphäre ausgelöst wird und dadurch auch nur ein einseitiges Erkrankungsmodell entsteht, lassen sich sehr gut Vergleiche innerhalb eines Individuums zur gesunden und intakten kontralateralen Hemisphäre ziehen. Um nun zu untersuchen wie sich BoNT-A auf den mittels 6-OHDA ausgelösten MP auswirkt, wurde den Ratten BoNT-A verabreicht. Da eine systemische Gabe mit vielen schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden ist, wurde im Rahmen dieses Projekts eine lokale Injektion mittels einer stereotaktischen Operation in das Striatum der Ratten durchgeführt. Sowohl der Erfolg der 6-OHDA-Läsion als auch der Therapieeffekt des BoNTs konnte von unserer Arbeitsgruppe in einem Verhaltenstest, dem „Apomorphin-Rotationstest“, überprüft werden. Für die Untersuchungen wurden die Tiere in insgesamt fünf experimentelle Gruppen eingeteilt:

- (1) Unbehandelte Ratten als Kontrolltiere
- (2) Hemi-Parkinson-Ratten
- (3) BoNT-A-injizierte Ratten
- (4) BoNT-A-injizierte Hemi-Parkinson-Ratten
- (5) Vehikel-injizierte Hemi-Parkinson-Ratten

Im Apomorphin-Rotationstest wurde festgestellt, dass das BoNT-A einen positiven Effekt auf die motorische Symptomatik des MP hat (Wree et al., 2011). Um den Behandlungserfolg nun auch auf Rezeptorebene zu untersuchen, hat sich ein weiterer Teil der Arbeitsgruppe mit dem Einfluss des dopaminergen Zelluntergangs und des daraus resultierenden Dopaminmangels auf die Neurotransmitter-Rezeptoren im Striatum und anderen Strukturen der Basalganglien beschäftigt. Für die Untersuchung möglicher Veränderungen der Neurotransmitter-Rezeptoren wurde die Methode der quantitativen in vitro Rezeptorautoradiographie verwendet. Hier wurden die Rezeptorautoradiogramme aller fünf Versuchsgruppen von verschiedenen Doktoranden ausgewertet. Um eine neuronale Plastizität der Rezeptoren sowie einen möglichen transienten Effekt von BoNT-A zu erfassen, wurden bei allen experimentellen Gruppen Überlebenszeiten zwischen drei Wochen und neun Monaten untersucht. Es konnte so bereits festgestellt werden, dass BoNT-A bei Hemi-Parkinson-Ratten (Gruppe 4) auch auf Rezeptorebene einen positiven Effekt auf die Erkrankung hat (Wree et al., 2011). Um diesen Therapieerfolg wissenschaftlich zu verstärken, habe ich mit meiner Arbeit die Wirkung des BoNT-A auf das Gehirn gesunder Tiere (Gruppe 3) mittels Rezeptorautoradiographie untersucht.

1.6 Allgemeiner Überblick über Botulinumneurotoxine

Um genauer zu verstehen wieso BoNT-A eine Therapieoption für MP darstellt, ist ein allgemeines Verständnis über das Toxin und dessen Wirkmechanismus grundlegend.

Botulinumneurotoxine (BoNTs) werden von sporenbildenden, anaeroben, gram-positiven Bakterien der Gattung Clostridium, genauer gesagt durch *C. botulinum*, *C. argentinense*, *C. butyricum* und *C. baratii* (Rossetto et al., 2014), produziert. Sie verursachen eine Lähmung von terminalen Nervenendigungen, welche neben der Störung des vegetativen Nervensystems insbesondere eine Muskelschwäche bis hin zum Versagen der Atemmuskulatur zur Folge hat. Aufgrund seiner Neurospezifität und seiner toxischen Wirksamkeit gilt es als das stärkste bekannte Nervengift, das in der Natur vorkommt (Gill, 1982; Arnon et al., 2001). Die Clostridien produzieren sieben verschiedene Serotypen des Botulinumtoxins, die von A bis G reichen. Jeder Serotyp ist auf Basis seiner Aminosäuresequenz noch einmal in verschiedene Subtypen unterteilt. Die ersten wissenschaftlichen Veröffentlichungen über das Toxin liegen mittlerweile fast 200 Jahre zurück und beruhen auf einer Krankheit, dem so genannten Botulismus – eine schwerwiegende Fleischvergiftung, welche zwischen 1817 und 1822 durch den schwäbischen Arzt und Dichter Justinus Kerner erkannt und beschrieben wurde. Er formulierte erstmals den Wirkmechanismus des Giftes und schlug bereits 1822 eine

niedrigdosierte therapeutische Behandlung vor (Erbguth, 2004). Offiziell wurde dann 1980 das BoNT vom Serotyp A erstmals von dem Ophthalmologen Alan B. Scott als Alternative zu Strabismus-Operationen erfolgreich eingesetzt. Seither bekam das BoNT sprunghaft ansteigende Bedeutung und die Ausbreitung auf weitere Anwendungsgebiete wurde möglich. Heute findet das BoNT zahlreiche Indikationen, wobei in der Humanmedizin bisher ausschließlich BoNT-A und -B eine Verwendung finden. In der Neurologie gehört es mittlerweile zur Standardtherapie von dystonen Bewegungsstörungen. Des Weiteren wird es zur Behandlung von Blepharospasmus, Hyperhidrosis, Spasmus hemifacialis sowie bei bestimmten spastischen Syndromen oder bei Spastiken nach einem Schlaganfall eingesetzt. Darüber hinaus besteht eine Zulassung für den Einsatz des BoNTs in der Schmerztherapie und seit 2006 auch zur Behandlung mimisch bedingter Falten. In Deutschland sind aktuell das autorisierte Botulinumtoxin Typ A (Botox®, Dysport® und Xeomin®) und Typ B (Neurobloc®) zur medizinischen Anwendung auf dem Markt.

1.6.1 Molekularer Aufbau und Wirkmechanismus

Bei den BoNTs handelt es sich um hochmolekulare Proteinkomplexe, die aus zwei Bestandteilen bestehen: dem eigentlichen, lähmend, paralytisch wirkenden neurotoxischen Teil und einem weiteren nichttoxischen Teil. Der nichttoxische Anteil besteht aus Komplexproteinen (Hüllproteinen) bakteriellen Ursprungs. Diese Komplexproteine haben die Funktion das Neurotoxin nach peroraler Aufnahme vor dem proteolytischen Abbau im sauren Magenmilieu zu schützen, sodass das Toxin eine weitere biologische Verfügbarkeit besitzt. Im neutralen pH-Wert der Gewebe zerfallen diese Komplexe. Bei einem medizinisch-therapeutischen Einsatz der BoNTs besitzen sie daher keine wesentliche Funktion (Oertel et al., 2011a). Das eigentliche Neurotoxin besteht aus einer leichten Kette (Molekülmasse von 50 kDa) und aus einer schweren Kette (Molekülmasse von 100 kDa). Die beiden Ketten sind über Disulfidbrücken und nicht kovalente Interaktionen miteinander verbunden. Die leichte Kette verschlüsselt die eigentliche toxische Wirkung und fungiert als zinkabhängige Metalloprotease. Sie spaltet im terminalen Axon cholinergischer Nerven spezifisch eine Aminosäurebindung eines Proteins des so genannten SNARE (soluble Nethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor)- Komplexes (Schiavo et al., 2000; Montal, 2010; Rossetto et al., 2013; Mazzocchio and Caleo, 2015). Dieser SNARE-Komplex ist verantwortlich für die Verschmelzung der Transmittervesikelmembran mit der präsynaptischen Membran und ist somit essentiell für die Exozytose der Neurotransmitter aus der Präsynapse in den synaptischen Spalt (Schiavo et al., 2000). Der SNARE-Komplex

besteht aus verschiedenen Proteinen. Zu ihnen gehören das Synaptobrevin (Vesikel assoziiertes Membranprotein, VAMP), das Syntaxin und das SNAP-25 (Synaptosom-assoziiertes Protein 25 kD). Diese Proteine dienen als Substrate für die leichte Kette der verschiedenen BoNTs und sind jeweils für die einzelnen Serotypen des BoNTs spezifisch. Das Protein SNAP-25 wird von BoNT-A, -C und -E gespalten, Synaptobrevin von BoNT-B, -D, -F und -G und Syntaxin von BoNT-C (Rossetto et al., 2014). Dieser Vorgang kann aber erst stattfinden, wenn die beiden Ketten getrennt werden. Denn das katalytische Zentrum der leichten Kette ist durch Bindung an die schwere Kette blockiert. Die schwere Kette des BoNTs besitzt zwei funktionelle Einheiten: eine C-terminale Einheit (HCC) sowie eine N-terminale Einheit (HCN). Diese beiden Einheiten haben jeweils eine unterschiedliche Aufgabe. Die HCN ist für die Vermittlung der Bindung an der Zielstruktur verantwortlich. Über spezifische Bindungsdomänen kann sie selektiv an Ganglioside und Rezeptoren der präsynaptischen Membran binden. Für jeden Serotyp gibt es unterschiedliche Bindungsrezeptoren (=synaptische Vesikelproteine). Das für unsere Studie wichtige BoNT-A bindet an das Synaptische Vesikel Protein Typ 2 (SV2) (Stenmark et al., 2008). Das Toxin wird nach der Bindung an die entsprechenden Rezeptoren (BoNT-A an SV2) internalisiert und in Endosomen ins Zytosol transportiert. Im sauren Milieu der Endosomen kommt es zur Protonierung des BoNTs und somit zu einer Konformationsänderung. Das BoNT erhält durch die Protonierung eine positive Gesamtladung, wodurch es zu einer Interaktion mit der negativ geladenen Endosomenmembran kommt. Es folgt eine Verlagerung des HCN der schweren Kette in die hydrophobe Ebene der Membran, wo es eine Pore bildet, durch welche die leichte Kette ins Zytosol gelangen kann. Während der Passage kommt es zu einer Entfaltung der Kette und die Disulfidbrücke zwischen der leichten und der schweren Kette wird durch zelleigene Reduktionsenzyme getrennt. Durch diese Trennung der beiden Ketten liegt nun das katalytische Zentrum der toxischen leichten Kette frei, wodurch sie nach einer erneuten Faltung ihre volle Funktionsfähigkeit in der Spaltung des SNARE-Komplexes erhält. Durch die daraus resultierende fehlende Transmitterfreisetzung des Acetylcholins in den synaptischen Spalt, kommt es zum Ausbleiben der Erregungsweiterleitung an den cholinergen Neuronen.

1.6.2 BoNT-A und Morbus Parkinson

Wie zuvor bereits erwähnt, stellt das BoNT-A eine vielversprechende Therapiemöglichkeit des MP dar. Die für die Symptome zugrundeliegende übermäßige Aktivität cholinergischer Interneurone kann durch eine lokale Gabe der in Deutschland zugelassenen BoNT-A Präparate (Botox®, Allergan, Xeomin® und Dysport) aufgehoben werden. Des Weiteren hat es sich im Gegensatz zu vorherig angewandten, systemisch verabreichten, Anticholinergika wie z.B. Biperiden als effektives und vor allem nebenwirkungsarmes Medikament gezeigt. Darüber hinaus ist es nicht nur zur Behandlung der Kardinalsymptome, sondern auch für eine Reihe weiterer, mit Parkinson assoziierter Symptome, geeignet. Die bisher systemische Therapie mit Anticholinergika wird durch zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen wie zum Beispiel Unruhe, kognitive Beeinträchtigungen, Herzrhythmusstörungen, Xerostomie und Magen-Darm-Störungen, eine Grenze gesetzt. Daher stellt eine lokale, direkte Injektion von BoNT-A in das betroffene Areal eine hervorragende Option dar, dieser Tatsache entgegenzuwirken. Im Hemi-Parkinson-Modell der Ratte, einem weitverbreitetem Tiermodell mit der Pathologie des Morbus Parkinson, lässt sich dies unter anderem nachweisen. Durch die Applikation des 6-OHDA wird die parkinsontypische Degeneration der dopaminergen Neurone im SNc hervorgerufen, welche eine Hochregulation der Expression von postsynaptischen, ipsilateralen Dopaminrezeptoren striataler Neurone zur Folge hat. Ein systemisch appliziertes Apomorphin kann an die Dopaminrezeptoren binden und diese somit aktivieren, sodass es zu einer Drehbewegung (Rotation) der Tiere zur entgegengesetzten Seite der Läsion kommt (Wree et al., 2011). Die Rotationen der Tiere beweisen eine erfolgreiche Läsion mittels des 6-OHDAs. Durch eine Injektion von BoNT-A in das Striatum lassen sich die pro Zeiteinheit ausgeführten Rotationen deutlich vermindern. Dies zeigt demzufolge auch den positiven Effekt des BoNT-A auf die motorische Symptomatik des experimentellen Hemi-Parkinson.

1.7 Rezeptoren

Im Rahmen der Studie befasste sich unserer Arbeitsgruppe mit der Interaktion zwischen insgesamt 18 verschiedenen Neurotransmitter-Rezeptoren und dem Wirkstoff BoNT-A. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Rezeptorautoradiographie ligandenspezifisch 16 Rezeptoren im Rattengehirn untersucht (siehe Tabelle 1). Der glutamaterge AMPA-Rezeptor und der Dopaminrezeptor D₂/D₃ wurden für meine Versuchsgruppe (BoNT-A-injizierte Wildtypen) bereits von anderen Doktoranden untersucht und sind somit hier nicht aufgeführt. Alle untersuchten Rezeptoren sind in hoher Anzahl im Striatum lokalisiert und werden auf

MSNs, Interneuronen oder auf afferenten Fasern aus dem Kortex, dem Thalamus, der Substantia nigra (pars compacta), dem Locus coeruleus und den Raphekernen exprimiert. Die Rezeptoren und jeweiligen Transmittersysteme interagieren untereinander und modulieren so die Funktion der Basalganglienschleife.

Tabelle 1 Übersicht der analysierten Rezeptoren. Es erfolgte eine Unterteilung nach Rezeptorklasse und Rezeptor-Subtyp. Ebenfalls aufgeführt wurden die Art der Signaltransduktion sowie der verwendete Radioligand. Metabotroper Rezeptor = G-Protein gekoppelte Transmembranproteine, die Signaltransduktion über „second messenger“ steuern. Ionotroper Rezeptor = ligandengesteuerter Ionenkanal.

Rezeptorklasse	Rezeptor	Signaltransduktion	Ligand
ACH-Rezeptoren	mACh: M ₁	metabotrop	Pirenzipin
	mACh: M ₂ (Antagonist)	metabotrop	AF-DX384
	mACh: M ₂ (Agonist)	metabotrop	Oxotremorin
	mACh: M ₃	metabotrop	4-DAMP
	nACh	ionotrop	Epibatidin
Glutamat-Rezeptoren	KAINAT	ionotrop	Kainat
	NMDA	ionotrop	MK801
	mGlu _{2/3}	metabotrop	LY341,495
Serotonin-Rezeptor	5HT _{2A}	metabotrop	Ketanserin
Dopamin-Rezeptor	D ₁	metabotrop	SCH23390
GABA-Rezeptoren	GABA A	ionotrop	Muscimol
	GABA A _{mit BZ-BS}	metabotrop	Flumazenil
	GABA B	metabotrop	CGP52626
Adenosin-Rezeptoren	A ₁	metabotrop	DPCPX+Gpp
Adrenozeptoren	α ₁	metabotrop	Prazosin
	α ₂	metabotrop	UK14,304

1.7.1 Quantitative Rezeptorautoradiographie

Die aufgeführten Rezeptoren wurden mit Hilfe der Autoradiographie untersucht. Die Autoradiographie ist ein photographisches Verfahren zum Nachweis und zur Charakterisierung radioaktiver Stoffe, wobei die Strahlung des radioaktiven Stoffes als Zerfallsereignis pro Zeiteinheit gemessen wird. Die Strahlung erzeugt auf einem aufgelegten Film ein entwickelbares Muster von Schwärzungen, das als Autoradiogramm bezeichnet wird. Die zur Autoradiographie am häufigsten eingesetzten radioaktiven Isotope sind ³H (Tritium), ¹⁴C (Kohlenstoff), ³⁵S (Schwefel) und ³²P (Phosphor). Bei dem speziellen Verfahren der Rezeptorautoradiographie wird ein Ligand, der zum Beispiel einen endogenen

Neurotransmitter darstellt oder zuvor synthetisch hergestellt wurde, mit solch einem radioaktiven Isotop markiert. Dieser entstandene Komplex aus Ligand und radioaktiven Isotop kann weiterhin an einen Rezeptor binden und hat darüber hinaus die Fähigkeit über den radioaktiven Zerfall des radioaktiven Stoffes Strahlung zu emittieren. Die Rezeptorautoradiographie stellt somit eine quantitative Darstellung der verschiedenen Rezeptortypen, die beim MP eine Rolle spielen, dar und verkörpert daher einen wichtigen Ausgangspunkt für die Entwicklung von neuen Therapieverfahren. Bei der Rezeptorautoradiographie wird ein "in-vivo-Verfahren" von einem "in-vitro-Verfahren" unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurde die in vitro Rezeptorautoradiographie genutzt. Diese wurde nach standardisierten und bereits publizierten Protokollen durchgeführt (Zilles et al., 1991a, 1991b, 1993, 2002), um die Dichte einer Vielzahl unterschiedlicher Rezeptormoleküle an zuvor hergestellten Gewebeschnitten (siehe 2.4) regionspezifisch und quantitativ zu bestimmen.

Die von mir untersuchten Rezeptoren werden im Folgenden kurz erläutert.

1.7.2 Acetylcholinrezeptoren

Bei den ACh-Rezeptoren handelt es sich um Transmembranrezeptoren, die den Neurotransmitter ACh binden. Pharmakologisch werden zwei verschiedene Typen unterschieden: die muskarinischen ACh-Rezeptoren und die nikotinischen ACh-Rezeptoren.

Muskarinische ACh-Rezeptoren

Der muskarinische Acetylcholinrezeptor (mAChR) ist aus einer Kette von ca. 400-500 Aminosäuren aufgebaut, welche die Zellmembran mit sieben transmembranen α -Helices durchspannt. Daher spricht man auch von einem heptahelikalen Rezeptor. Er weist einen extrazellulär liegenden N-terminus, einen intrazellulär liegenden C-Terminus sowie drei interhelikale Schleifen an jeder Membranseite auf. Der mAChR gehört zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, das heißt auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite des Rezeptors ist ein heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein (kurz G-Protein) gebunden. Über dieses G-Protein kann eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst werden. Die mAChRs gehören demnach zu den metabotropen Rezeptoren. Durch Klonierungsstudien sind fünf verschiedene Subtypen des mAChR (M_1 - M_5) identifiziert worden (Bonner et al., 1987, 1988; Peralta et al., 1987). Diese unterscheiden sich bezüglich ihrer gewebespezifischen Verteilung im zentralen Nervensystem (ZNS) und ihrer verschiedenen Klassen der G-Protein-Untereinheiten voneinander.

Nikotinische ACh-Rezeptoren

Bei dem nikotinischen ACh-Rezeptor (nAChR) handelt es sich um ein Transmembranprotein, das aus fünf Untereinheiten besteht, welche die Plasmamembran jeweils viermal durchspannen. Die Untereinheiten (2x α 1-, β 1-, γ -, δ -Untereinheit) sind zylinderartig als Ionenkanal angeordnet. Daher werden die nAChRs, im Gegensatz zu den mAChRs, auch als ionotrope Rezeptoren bezeichnet. Die α -Untereinheit stellt die Ligandenbindungsstelle dar. Da diese zweimal vorliegt, sind für die Aktivierung des Rezeptors zwei Moleküle ACh notwendig. Die Lokalisation der nAChR innerhalb des CPU wird vorwiegend auf nigrostriatalen und korticostriatalen Endigungen und auf Cholineacetyltransferase-immunreaktiven (ChAT-ir) Interneuronen beschrieben (Hunt and Schmidt, 1978; Clarke et al., 1985; Happe et al., 1994; Arroyo-Jimenez et al., 1999; Kaiser and Wonnacott, 2000; Jones et al., 2001; Pradhan et al., 2002).

1.7.3 Glutamat-Rezeptoren

Die Glutamat-Rezeptoren (GluR) entfalten ihre Wirkung durch Bindung des exzitatorisch wirkenden Neurotransmitters Glutamat. Bei den GluRs wird, wie bei den Acetylcholinrezeptoren, zwischen den ionotropen (iGluR) und den metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR) unterschieden. Zu den iGluR gehören die AMPA-Rezeptoren, NMDA-Rezeptoren und Kainat-Rezeptoren. Die mGluR sind den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen und werden hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften und ihrer Signalkaskaden in acht Rezeptoren (mGlu₁ bis mGlu₈) unterteilt. Gegenstand meiner Arbeit sind die Kainat-, NMDA- und mGlu_{2/3}-Rezeptoren, welche im Folgendem eine kurze Erläuterung finden.

Kainat-Rezeptoren

Kainat-Rezeptoren sind tetramere Ionenkanäle. Sie besitzen eine Permeabilität für kleine Kationen wie Na⁺, K⁺, Ca²⁺ und Cs⁺ und sind für Anionen undurchlässig. Entsprechend ihres elektrochemischen Gradienten können nach Öffnen der Kanäle Na⁺ und Ca²⁺ ins Zellinnere strömen und K⁺ die Zelle verlassen. Demzufolge kommt es aufgrund des Ionenstroms in die Zelle zu einer Depolarisation. Die Kainat-Rezeptoren lassen sich zwei verschiedenen Familien (high und low affinity) zuordnen. Diese setzen sich aus unterschiedlichen Untereinheiten zusammen, wobei die Zusammensetzung als Homo- oder Heterotetramer erfolgen kann. Die niedrig-affinen Untereinheiten GluR5-7 sind auf dem Gen grik 1-3 codiert und werden deshalb auch als GluK 1-3 bezeichnet. Die Informationen für die hoch-affinen

Untereinheiten Ka1 und Ka2 sind auf dem Gen *grik 4* und *grik5* lokalisiert und werden auch als GluK4 und GluK5 benannt. Für diese gilt, dass sie zur Bildung eines funktionellen Ionenkanals mit mindestens einer Untereinheit aus der Familie der niedrig-affinen Kainat-Rezeptoren interagieren müssen (Cui and Mayer, 1999).

NMDA-Rezeptoren

Die an der postsynaptischen Membran sitzenden NMDA-Rezeptoren sind Ionenkanäle. Sie besitzen verschiedene Bindungsstellen für unterschiedliche Liganden, die durch eine Strukturänderung des Kanals die Kanalleitfähigkeit beeinflussen. Neben der Agonistenbindungsstelle für Glutamat, dem artifiziellen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und dem Co-Agonisten Glycin, weist der Rezeptor auch eine Affinität für verschiedene Antagonisten wie z.B. Ketamin, PCP und MK 801 (Dizocilpin) im inneren des Kanals auf. Diese fungieren dort dementsprechend als Kanalblocker. Die NMDA-Rezeptoren sind aus vier Untereinheiten aufgebaut. Es sind bisher drei Gruppen der Untereinheiten bekannt: GluN1, GluN2 und GluN3, welche wiederum weitere Subtypen besitzen. Für GluN1 sind acht verschiedene Splice-Varianten (A-H), für GluN2 vier Subtypen (A, B, C und D) und für GluN3 zwei Subtypen (A und B) bekannt (Loftis and Janowsky, 2003). Durch die Kombination der verschiedenen Subtypen entstehen unterschiedliche Rezeptoren. Die meisten NMDA-Rezeptoren sind aus zwei GluN1-Untereinheiten und aus zwei GluN2-Untereinheiten zusammengesetzt. Der Aufbau aus zwei GluN1- und zwei GluN3-Untereinheiten sowie die Kombination aus GluN2- und GluN3-Untereinheiten ist aber ebenfalls möglich. Voraussetzung für die Funktionalität der Rezeptoren ist eine heterogene Zusammensetzung der Untereinheiten. Dementsprechend sind Rezeptoren, die sich aus nur einer Gruppe der Untereinheiten zusammensetzten, nicht funktionstüchtig.

mGlu_{2/3}-Rezeptoren

Die mGluR werden in acht Gruppen unterteilt. Diese zeigen allesamt eine starke Ähnlichkeit in ihrer Primärstruktur und weisen eine über 40%ige Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz auf. Die mGluR werden aufgrund ihrer Aminosäurehomologie noch einmal in drei Gruppen klassifiziert, wobei die Rezeptoren innerhalb einer Gruppe ihre Aminosäuresequenz über 70% teilen und somit eine besonders hohe Übereinstimmung bezüglich ihrer Pharmakologie und rezeptorabhängigen Signaltransduktion aufweisen (Pin and Duvoisin, 1995). Die in meiner Arbeit untersuchten mGlu_{2/3} Rezeptoren werden zur Gruppe 2 zusammengefasst. Sie sind Gi-Protein gekoppelt und hemmen demnach die

Adenylatcyclase und somit die cAMP-Produktion, die neuronale Aktivität und die Glutamatfreisetzung (Nicoletti et al., 1996). Die Heterogenität der mGluRs manifestiert sich nicht nur in den molekularen Unterschieden der einzelnen mGluR Typen, sondern auch in ihrer Expression an der Synapse. Die mGluRs der Gruppe zwei sind sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert, wobei die mGluR₂ eher eine extrasynaptische und die mGluR₃ hauptsächlich eine postsynaptische Lokalisation aufweisen. Neben seiner neuronalen Expression wurde der mGluR₃ auch auf Gliazellen nachgewiesen, wo er vor allem für die Glutamatsynthese und -aufnahme zuständig ist (Petrulia et al., 1996; Shigemoto et al., 1997; Cartmell and Schoepp, 2000).

1.7.4 Serotonin-Rezeptoren

Die Serotonin-Rezeptoren (5-Hydroxytryptaminrezeptoren, 5-HT-Rezeptoren) sind sowohl im peripheren Nervensystem (PNS) als auch im ZNS lokalisiert. Des Weiteren findet man sie aber auch in Geweben des Magen-Darm-Traktes und des Herzkreislaufsystems. Es sind mehrere verschiedene 5HT-Rezeptoren bekannt, die sieben Familien zugeordnet werden können: 5HT₁ bis 5HT₇. Weitestgehend handelt es sich bei den Rezeptoren um rhodopsinähnliche G-Protein-gekoppelte, metabotrope Rezeptoren. Lediglich die 5HT₃-Rezeptoren stellen ligandengesteuerte Ionenkanäle dar. Gegenstand meiner Arbeit ist der 5HT_{2A} Rezeptor.

5HT_{2A}

Die 5HT_{2A}-Rezeptoren vertreten einen der drei Subtypen (A, B, C) der Familie der 5HT₂-Rezeptoren. Die Rezeptoren der 5HT₂-Familie sind an Gq/11-Proteine gekoppelt und sind somit am Phospholipase C-Signalweg beteiligt.

1.7.5 Dopamin-Rezeptoren

Bei den Dopamin-Rezeptoren (DR) handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Sie durchspannen mit ihren sieben Domänen die Membran und besitzen spezifische Bindungsstellen für das Katecholamin Dopamin. Es existieren fünf verschiedene Dopamin-Rezeptoren (D₁-D₅), welche hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Signalkaskaden, verschiedenen Affinitäten zu Agonisten bzw. Antagonisten und unterschiedlichen Funktionen in zwei Gruppen unterteilt werden können. Zu der Gruppe der D₁-ähnlichen Rezeptoren gehören die D₁- und die D₅-Rezeptoren. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch die Aktivierung der Adenylatcyclase die cAMP-Konzentration in der Zelle erhöhen und somit

letztendlich eine exzitatorische Wirkung besitzen. Die Dopamin-Rezeptoren D₂, D₃ und D₄ gehören zur Gruppe der D₂-ähnlichen Rezeptoren und haben über die Aktivierung eines Gi-Proteins eine negative Wirkung auf den cAMP-Spiegel in der Zelle und wirken dementsprechend inhibitorisch. Darüber hinaus aktiviert diese Gruppe Kalium-Kanäle, wodurch eine Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials erreicht wird und eine Erregung der Zelle unwahrscheinlicher wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Dichte der D₁-Rezeptoren mittels Rezeptorautoradiographie nach der BoNT-A Applikation untersucht.

Dopamin-D₁-Rezeptor

Der D₁-Rezeptor wird durch das DRD1 Gen kodiert und ist der am häufigsten vorkommende Dopamin-Rezeptor im ZNS. Die D₁-Rezeptoren weisen eine sehr hohe Dichte im CPU auf. Sie sind dort hauptsächlich auf MSNs lokalisiert. Des Weiteren sind sie mit einer hohen Anzahl in der Substantia nigra pars compacta vertreten (Boyson et al., 1986; Savasta et al., 1986; Altar and Marien, 1987; Araki et al., 2000). Insgesamt ist in limbischen Regionen und im frontalen Kortex, bei allgemein geringerer Rezeptordichte, der Anteil der D₁-Rezeptoren vergleichsweise höher als jener der D₂-Rezeptoren.

1.7.6 GABA-Rezeptoren

Die GABA Rezeptoren binden spezifisch den inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und werden prinzipiell in ionotrope und metabotrope Rezeptoren unterschieden. Es existieren drei Subtypen (GABA A, GABA A- ρ und GABA B), wobei der GABA A- und GABA A- ρ -Rezeptor den ionotropen und der GABA B den metabotropen Rezeptoren zuzuordnen ist. Der GABA A- ρ -Rezeptor wird in der Literatur überwiegend als GABA C-Rezeptor bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden der GABA A-Rezeptor und der GABA B-Rezeptor genauer untersucht.

GABA A

Die GABA A-Rezeptoren bilden eine heteropentamere Gruppe ligandengesteuerter Ionenkanäle, die bei Aktivierung eine Kanalpore für Chloridionen öffnen. Sie setzen sich aus einem großen Untereinheiten-Pool aus bisher 19 identifizierten verschiedenen Untereinheiten, kodiert durch jeweils separate Gene (α 1- α 6, β 1- β 3, γ 1- γ 3, δ , ϵ , θ , π and ρ 1- ρ 3), zusammen (Korpi et al., 2002; Rudolph and Möhler, 2006; Whiting, 2006). Jede Untereinheit ist aus vier transmembranären Domänen aufgebaut, wobei jeweils die zweite Domäne die Kanalpore formt und somit eine Durchlässigkeit vor allem für Chlorid- und Hydrogencarbonat

gewährleistet ist. Die meisten GABA A-Rezeptoren setzen sich aus 2α , 2β und einer γ Untereinheiten zusammen. Abhängig von der Zusammensetzung der einzelnen Untereinheiten unterscheiden sich die GABA A-Rezeptoren in ihrer Affinität zu GABA, in ihrer Pharmakologie und Zelllokalisierung (Goetz et al., 2007). Die am häufigsten vorkommende Kombination im Rattenhirn ist der Aufbau aus $\alpha 1$, $\beta 2/3$ und $\gamma 2$ (Fritschy and Mohler, 1995; McKernan and Whiting, 1996). Diese Variante wurde vor allem auf den Perykarien, Dendriten und Spines nachgewiesen und mit einer hohen Frequenz im Striatum auf MSNs, striatalen Interneuronen und einer Subpopulation von Neuronen im Globus pallidus detektiert (Fujiyama et al., 1999).

GABA A mit Benzodiazepinbindungsstellen

Der GABA A-Rezeptor besitzt neben der Bindungsstelle für GABA noch eine Bindungsstelle für Benzodiazepin und benzodiazepinartige Substanzen. Während sich die Ligandenbindungsstelle für GABA an den zwei α -Untereinheiten (an der Kontaktstelle zur β -Untereinheit) befindet, ist die Bindungsstelle für Benzodiazepin an der Kontaktstelle der α -Untereinheit zur γ -Untereinheit lokalisiert. Wie bereits oben beschrieben codieren sechs verschiedene Gene für die α -Untereinheit. Jedoch sind nicht alle α -Untereinheiten in der Lage, mit der γ -Untereinheit eine Benzodiazepinbindungsstelle zu bilden. Lediglich $\alpha 1$, 2 , 3 und 5 sind dazu fähig.

GABA B

Der aus sieben Transmembrandomänen bestehende metabotrope GABA B-Rezeptor ist ein G-protein gekoppelter Rezeptor, welcher seine Signaltransduktion über ein G_i -Protein vermittelt und über diesen Weg die Leitfähigkeit für Calcium vermindert und die Öffnung von Kaliumkanälen auslöst. Demnach haben sie mit dieser Minderung des depolarisierenden Calciumeinstromes und mit dem hyperpolarisierenden Kaliumausstrom eine inhibitorische Wirkung auf Nervenzellen. Es existieren von den GABA B-Rezeptoren zwei Rezeptorisoformen (GABA B₁ und GABA B₂-Rezeptoren), die als Heterodimere miteinander assoziiert sind (Marshall et al., 1999). Die Rezeptoren sind mit einer hohen Dichte im Striatum verbreitet. Dort sind sie sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert, wobei die Mehrheit (65%) einen postsynaptischen Sitz aufweist (Lacey et al., 2005).

1.7.7 Adenosin-Rezeptoren

Die Adenosin-Rezeptoren werden hinsichtlich ihrer Pharmakologie in vier Rezeptoren unterteilt: die A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 Rezeptoren. Sie gehören allesamt der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren an.

A_1R

Der A_1R ist der meist untersuchte Rezeptorsubtyp von allen Adenosin-Rezeptoren. Er ist mit einem inhibitorischen G Protein der G_i/o Familie assoziiert und wirkt somit negativ auf die cAMP-Konzentration und auf die davon abhängigen Signalwege. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden viele A_1R -Agonisten und -Antagonisten identifiziert. Die Agonisten lassen sich strukturell alle vom physiologischen Agonisten Adenosin ableiten, wohingegen die Antagonisten vornehmlich der Struktur vieler Xanthin-Derivate (Koffein und Theophyllin) ähneln (Müller and Scior, 1993). Der A_1R ist ubiquitär im ZNS lokalisiert und wird vor allem mit einer hohen Dichte im Kortex, Hippocampus und Cerebellum exprimiert.

1.7.8 Adrenozeptoren

Die Adrenozeptoren werden ebenfalls den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet. Die Signalkaskade dieser metabotropen Rezeptoren wird durch Bindung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin ausgelöst. Es existieren drei Familien, die jeweils verschiedene Subtypen beinhalten: α -Adrenozeptoren (mit den Subtypen α_{1A} , α_{1B} und α_{1D}), (mit den Subtypen α_{2A} , α_{2B} und α_{2C}) und β -Adrenozeptoren (mit den Subtypen β_1 , β_2 und β_3).

α_1 -Adrenozeptoren (α_1R)

Die α_1R s sind an ein G_{q11} -Protein gebunden und aktivieren nach Bindung des entsprechenden Liganden die Phospholipase C und sind somit an der Bildung der Second Messenger IP3 und DAG beteiligt. Sie sind intrastriatal auf präsynaptischen Endigungen kortikaler und thalamischer Afferenzen und auf Interneuronen lokalisiert (Morrow et al., 1985; Zilles et al., 1993; Rommelfanger et al., 2009).

α_2 -Adrenozeptoren (α_2R)

Wie bereits oben beschrieben werden dem α_2R drei Subtypen zugeordnet. Bei Nagern wurde noch ein weiterer Subtyp (α_{2D}) beschrieben, welcher eine Variante des humanen α_{2A} -Rezeptors darstellt. Der Signalübertragungsweg wird über ein hemmendes G_i -Protein vermittelt.

1.8 Bisherige Ergebnisse und Fragestellung

Wie bereits am Anfang beschrieben, ist durch vorherige experimentelle Versuche unserer Arbeitsgruppe bekannt, dass die lokale Gabe von BoNT-A bei der Ratte therapeutisch einen positiven Effekt auf den experimentellen Hemi-Parkinson hat. Anhand des 6-OHDA-Modells der Ratte wurde gezeigt, dass BoNT-A hinsichtlich seiner anticholinergen Wirkung auf striatale Interneurone fähig ist, eine Minimierung der parkinsontypischen motorischen Beschwerden hervorzurufen. Mittels Rezeptorautoradiographie wurde bereits untersucht, inwiefern sich eine 6-OHDA induzierte MP-Erkrankung und eine anschließende Behandlung mit BoNT-A auf die Rezeptordichte der in Tabelle 1 genannten Rezeptoren auswirkt und inwieweit es im Rahmen der dopaminergen Denervierung zu Veränderung dieser Rezeptordichten im Striatum kommt. Die Untersuchungen ergaben, dass bei den Hemi-Parkinson-Ratten die striatalen Rezeptordichten dopaminerg, serotonerg und cholinerg Rezeptoren deutlich verändert waren. Die striatalen D₂/D₃-Rezeptoren wiesen eine signifikant erhöhte Rezeptordichte im Striatum auf. Die nikotinischen ACh-Rezeptoren und die serotonergen 5HT_{2a}-Rezeptoren zeigten eine deutlich reduzierte Rezeptordichte. Nach der BoNT-A Injektion in das Striatum wurde die in Hemi-Parkinson-Ratten pathologisch erhöhte Rezeptordichte des D₂/D₃-Rezeptors normalisiert. Dies korreliert mit einer signifikanten Verbesserung der Motorik der Hemi-Parkinson-Ratten.

Um diesen therapeutisch wichtigen positiven Effekt des BoNTs auf die bei Hemi-Parkinson entstandenen motorischen Beschwerden näher zu charakterisieren, stellt sich die Frage, ob eine intrastriatale Gabe des BoNT-A bei Ratten, ohne Hemi-Parkinson überhaupt einen Einfluss auf die Rezeptordichten im Rattenhirn besitzt oder nicht. Gegenstand meiner Arbeit ist es deshalb, die Wirkung von intrastriatal injizierten BoNT-A auf die Rezeptordichten zahlreicher Areale innerhalb und außerhalb der Basalganglienschleife des Gehirns der Ratte mittels Rezeptorautoradiographie zu beschreiben.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und stereotaktische Operationen

Für die Versuche wurden 124 männliche, 3 Monate alte Wistar-Ratten (Stamm: CrI:WI BR) verwendet. Diese wurden vom Unternehmen Charles River WIGA aus Sulzfeld, Deutschland bezogen. Die Tiere wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ unter einem zwölfstündigen Tag/Nacht Rhythmus gehalten. Es wurden jeweils drei Ratten in einem standardisierten Käfig untergebracht. Sie hatten jederzeit einen uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Nahrung. Die Haltung und Behandlung der Tiere erfolgte entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen des deutschen Tierschutzes und wurde im Tierlabor des Institutes für Anatomie der Universität Rostock durchgeführt. 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

Die operativen Eingriffe wurden ausschließlich unter Narkose durch Herrn Prof. Andreas Wree am Institut für Anatomie durchgeführt. Die Narkotisierung erfolgte dabei mittels einer intraperitoneal applizierten Lösung aus Ketamin (50mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (4 mg/kg Körpergewicht). Alle Versuchstiere wiesen ein Körpergewicht von rund 300g auf.

2.3 Intrastriatale Botulinumneurotoxin-Applikation

Nach der Narkotisierung wurden die Tiere in einer stereotaktischen Apparatur fixiert und das BoNT-A intrastriatal in die Rattengehirne injiziert. Dabei wurde jeweils eine 1 μl verdünnte Lösung an insgesamt zwei Injektionsstellen in das rechte CPu appliziert (siehe Abbildung 2). Die Injektion erfolgte, in Bezug auf Bregma, an folgenden Koordinaten: Injektionsstelle 1: anterior/posterior +1,3 mm; lateral -2,6 mm; ventral -5,5 mm; Injektionsstelle 2: anterior/posterior -0,4 mm; lateral -3,6 mm; ventral -5,5 mm (Paxinos and Watson, 2007). Die verdünnte BoNT-A Lösung enthielt eine Gesamtdosis von 1ng BoNT-A (lot No. 13028A1A), welches zuvor als Pulverform vorlag und von der Firma List (Campbell, CA) produziert und von Quadratech (Surrey, UK) vertrieben wurde. Die Verdünnung der Lösung erfolgte durch eine Phosphatpufferlösung, welche mit einem 0,1%igem bovinem Serumalbumin versetzt war. Das bovine Serumalbumin hatte dabei die Aufgabe die BoNT-Moleküle vor einem frühzeitigen Zerfall zu bewahren. Die Applikation der BoNT-A-Lösung fand an jeder Injektionsstelle über vier Minuten, zu jeweils 0,25 $\mu\text{l}/\text{min}$ statt. Die Kanüle verblieb danach

für weitere fünf Minuten an der jeweiligen Injektionsstelle, um einen Rücklauf in den Spritzenkanal zu verhindern, damit das BoNT-A im CPu seine Wirkung entfalten kann.

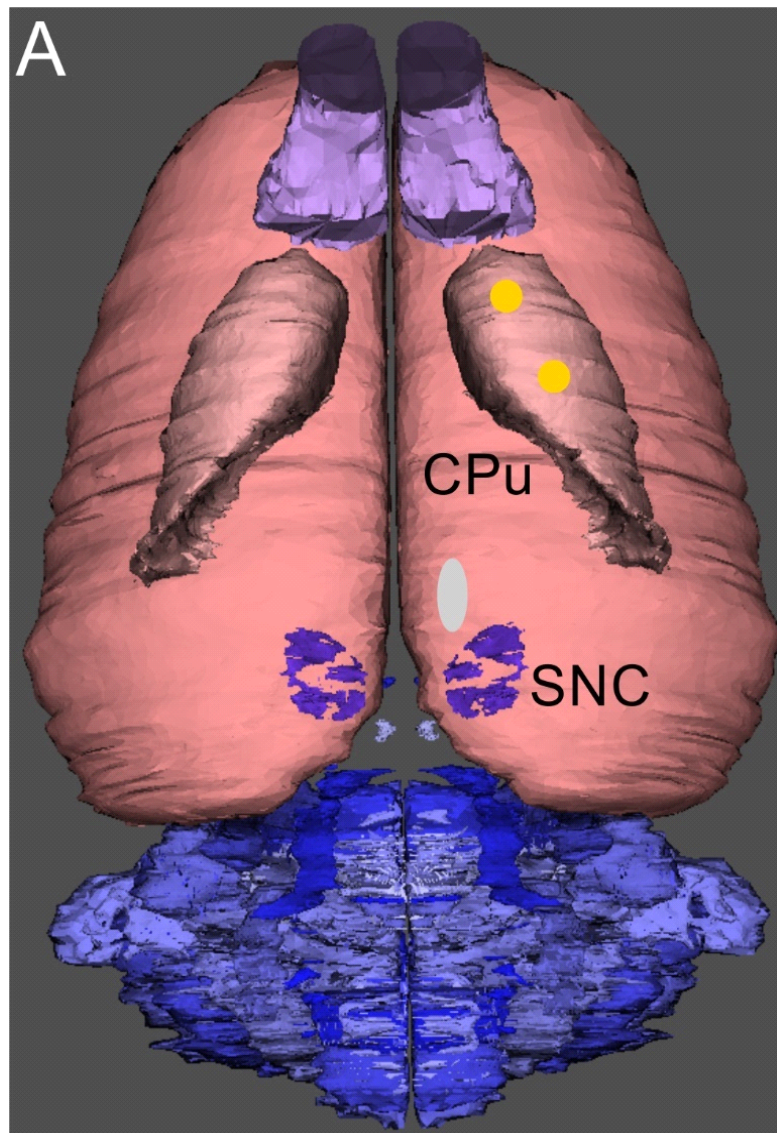


Abbildung 2 Dorsalsicht auf ein transparentes Rattenhirnmodell. Dargestellt sind die zwei Injektionsstellen von BoNT-A (gelbe Kreise) in das rechte/ipsilaterale CPu. In das linke/kontralaterale CPu erfolgte keine Injektion. Die linke Hemisphäre dient somit als Kontrollseite. Quelle: (Holzmann et al., 2012).

2.4 Tötung der Tiere und Fixierung der Gehirne

Mit einer Überdosis des Narkosemittels Ketamin und Xylazine fand die Tötung der Wistar-Ratten statt. Danach erfolgte die Entnahme der Rattengehirne. Im Anschluss dessen wurden die isolierten Gehirne im -50°C Isopentan schockgefroren und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung, dem Schneiden, gelagert. Die Gehirne wurden mit Gewebeklebstoff (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound) auf einen Objektisch bei -20°C aufgeklebt.

Anschließend wurden 20µm dicke Frontalschnitte mithilfe eines Kryostaten (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Pro Rattengehirn wurden Schnitte aus sieben vordefinierten Ebenen gewonnen. Die Ebenen waren im Bezug auf Bregma so gewählt, dass die zu untersuchenden Areale mehrfach erfasst wurden: Schnitt 1: +1,56 mm, Schnitt 2: -0,36 mm, Schnitt 3: -0,84 mm, Schnitt 4: -2,16 mm, Schnitt 5: -2,52 mm, Schnitt 6: -3,60 mm und Schnitt 7: -5,20 mm (Paxinos and Watson 2007). Jeder Hirnschnitt wurde separat auf einen mit Gelatine beschichteten, vorgekühlten (-20°C) Objektträger aufgeschmolzen. Danach erfolgte für ungefähr 25 Minuten eine Trocknung auf einer 35°C warmen Heizplatte. Abschließend wurden die Objektträger beschriftet und bis zu ihrer Weiterverwendung für die Rezeptorautoradiographie in Plastik-Tüten evakuiert und wiederum bei -80°C gelagert.

2.5 Herstellung der Rezeptorautoradiogramme

Um die unterschiedlichen Rezeptormoleküle an den zuvor hergestellten Gewebeschnitten regionsspezifisch und quantitativ zu bestimmen, benötigte es zunächst einer Rezeptorautoradiographischen Markierung. Dieser Prozess folgt im Wesentlichen drei Schritten: 1. die Vorinkubation, 2. die Hauptinkubation und 3. der Waschvorgang. Dies sind standardisierte Verfahren. Im ersten Schritt wurden die aufgetauten Hirnschnitte zunächst einem Vorinkubationspuffer ausgesetzt, um die im Gewebe befindlichen endogenen Substanzen (z.B. Neurotransmitter) zu entfernen und um die Rezeptorbindungsstellen den in der Hauptinkubation verwendeten radioaktiv markierten Liganden zugänglich zu machen. Die Zusammensetzung und der pH-Wert der Pufferlösung sind hierbei abhängig von den biochemischen Eigenschaften des Liganden und des Rezeptors. Daher variiert diese folglich für den jeweiligen zu untersuchenden Rezeptor. Im zweiten Schritt folgt die Hauptinkubation, wobei die Hirnschnitte mit dem radioaktiv markierten Liganden (Radioligand) inkubiert werden. Zur Markierung der Liganden wurde hier das radioaktive Isotope ^3H benutzt, da dies aufgrund der sehr hohen lokalen Auflösung besser als die oben genannten anderen radioaktiven Stoffe (^{14}C , ^{35}S , ^{32}P) geeignet ist. Beim Prozess der Hauptinkubation bindet der Radioligand nicht nur an den spezifischen Bindungsstellen des Rezeptors, sondern hat auch eine Affinität zu anderen, unspezifischen Bindungsstellen. Sowohl die Besetzung der spezifischen als auch der unspezifischen Bindungsstellen wird als Gesamtbindung bezeichnet. Zur Erfassung der unspezifischen Bindung werden die Hirnschnitte zusätzlich mit einem unmarkierten Liganden, einem so genannten Kompetitor, der in einer höheren Konzentration vorliegt und welcher eine höhere Affinität zur spezifischen Rezeptorbindungsstelle hat,

inkubiert. Dadurch werden die spezifischen Bindungsstellen durch den Kompetitor blockiert, sodass der ^3H -markierte Ligand nur noch an die unspezifischen Bindungsstellen binden kann. Demzufolge wird im Autoradiogramm nur die emittierte Strahlung des Radioliganden an den unspezifischen Bindungsstellen aufgezeigt. Der Datensatz der unspezifischen Bindung wird von der Gesamtbindung abgezogen, sodass man den Datensatz der spezifischen Bindung (durch den ^3H -markierten Liganden) erhält. Im Anschluss dessen erfolgte der dritte Schritt – der Waschvorgang. Der überschüssige Radioligand (nicht gebundener Radioligand) sowie Puffersalze, die Artefakte auf der Filmemulsion verursachen können, wurden anschließend in verschiedenen Waschschrritten entfernt. Nach dem Trocknen der Schnitte kann die Verteilung des Rezeptors durch das Exponieren gegen einen für radioaktiven, β -zerfallssensitiven Röntgenfilm (Kodak, Perkin Elmer LAS GmbH, Deutschland) sichtbar gemacht werden. Die Filme wurden zuvor in Abhängigkeit vom jeweiligen Liganden für bis zu 15 Wochen im Dunkeln bei 4°C exponiert, bei Raumtemperatur mit dem Kodak D19 System entwickelt, dann für 10 Minuten im Kodak Polymax System fixiert, anschließend 30 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen und zuletzt an der Luft getrocknet. Durch Vergleich mit histologisch gefärbten Parallelschnitten erfolgte die genaue Identifizierung von Arealen und Kerngebieten, und über einen geeigneten Kalibrierstandard die Quantifizierung der Rezeptorverteilung. Je dunkler eine Stelle im Autoradiogramm dargestellt wurde, desto höher ist die Rezeptordichte in dieser Region des Hirnschnittes. Die Schwärzungstiefe entspricht somit einer bestimmten Radioaktivität, welche wiederum ein Maß für die Anzahl spezifisch gebundener Radioliganden und somit für die Dichte besetzter Bindungsstellen ist.

2.6 Auswertung der Rezeptorautoradiogramme

Die Auswertung der Rezeptorautoradiogramme erfolgte mit Hilfe des computergestützten Programmes MCID Analysis v7.0 (InterFocus imaging Ltd, Linton, UK) (<http://www.mcid.co.uk/>). Die Rezeptorautoradiogramme wurden zuvor mittels einer CCD-Schwarz-Weiß-Kamera (Zeiss, Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen Germany) digitalisiert. Bevor die eigentliche densitometrische Messung beginnen konnte, wurden für jede Aufnahme, auf Grundlage der bekannten Grauwerte der Eichstandards aus dem Forschungszentrum Jülich, eine nichtlineare, interpolierte Kalibrierungskurve (cubic spline function) erstellt. Dabei wurde der Grauwert des Rezeptorautoradiogramms eines Bildausschnittes einer Ligandenkonzentration zugeordnet (Zilles et al., 2004). Dieser Grauwert liegt dabei im Wertebereich von 0 bis 255. Die hohen Grauwerte (im Bereich um 255) werden im rezeptorautoradiographischen Bild als hell bis weiß dargestellt. Sie sind

Ausdruck einer sehr geringen Rezeptordichte. Die niedrigen Grauwerte (im Bereich von 0) werden im Bild als dunkel bis schwarz dargestellt und lassen auf eine sehr hohe Rezeptordichte schließen. Jedes Rezeptorautoradiogramm wurde mit einer Kalibrierungskurve verknüpft. Die Messungen wurden für jeden Rezeptor und jedes Tier, für das jeweils eine Bilderserie von insgesamt sieben auswertbaren Bildern bestand, einzeln durchgeführt. Die rezeptorautoradiographischen Bilder entsprechen den Frontalschnitten des Rattenhirns von rostral nach kaudal in den vordefinierten Ebenen (siehe Abbildung 3).

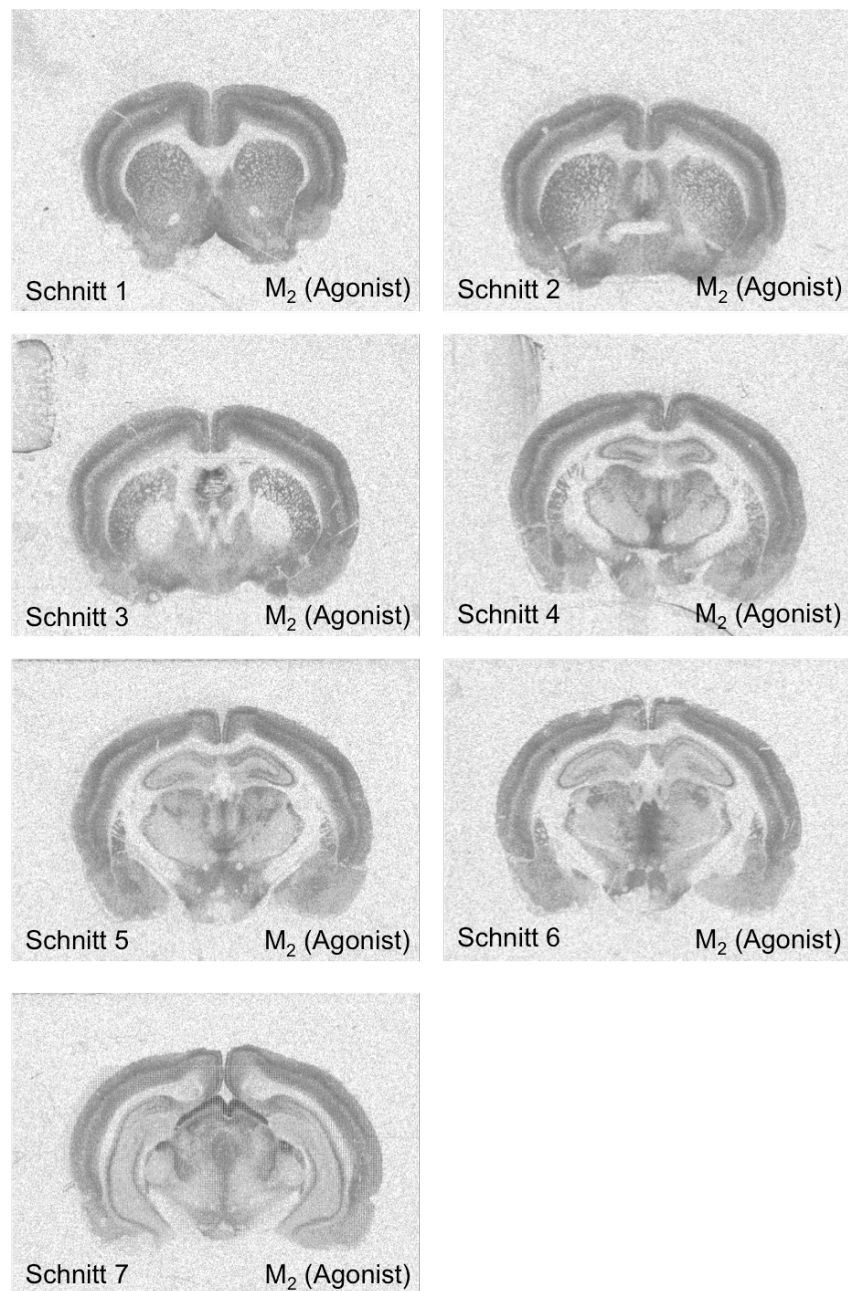


Abbildung 3 Bildserie von sieben rezeptorautoradiographischen Bildern. Dargestellt sind Frontalschnitte des Rattenhirns von rostral nach kaudal in vordefinierten Ebenen. Schnitte in Bezug auf das Bregma: Schnitt 1: +1,56 mm, Schnitt 2: -0,36 mm, Schnitt 3: -0,84 mm, Schnitt 4: -2,16 mm, Schnitt 5: -2,52 mm, Schnitt 6: -3,60 mm und Schnitt 7: -5,20 mm

Die Messungen der Regionen fand dabei für beide Hemisphären statt und wurde mit der „Click Outline“ Funktion durch Einrahmen der auszuwertenden Region durchgeführt. In den Schnittbildern, in denen Artefakte oder andere methodenbedingte Qualitätsverluste in den zu messenden Arealen zu finden waren, wurde die betroffene Region nur teilweise gemessen. Das heißt, es wurde dort nur der artefaktfreie Teil gemessen (siehe Abbildung 4). Ebenso wurde mit Hirnregionen verfahren, die von anderen Strukturen überlagert wurden.

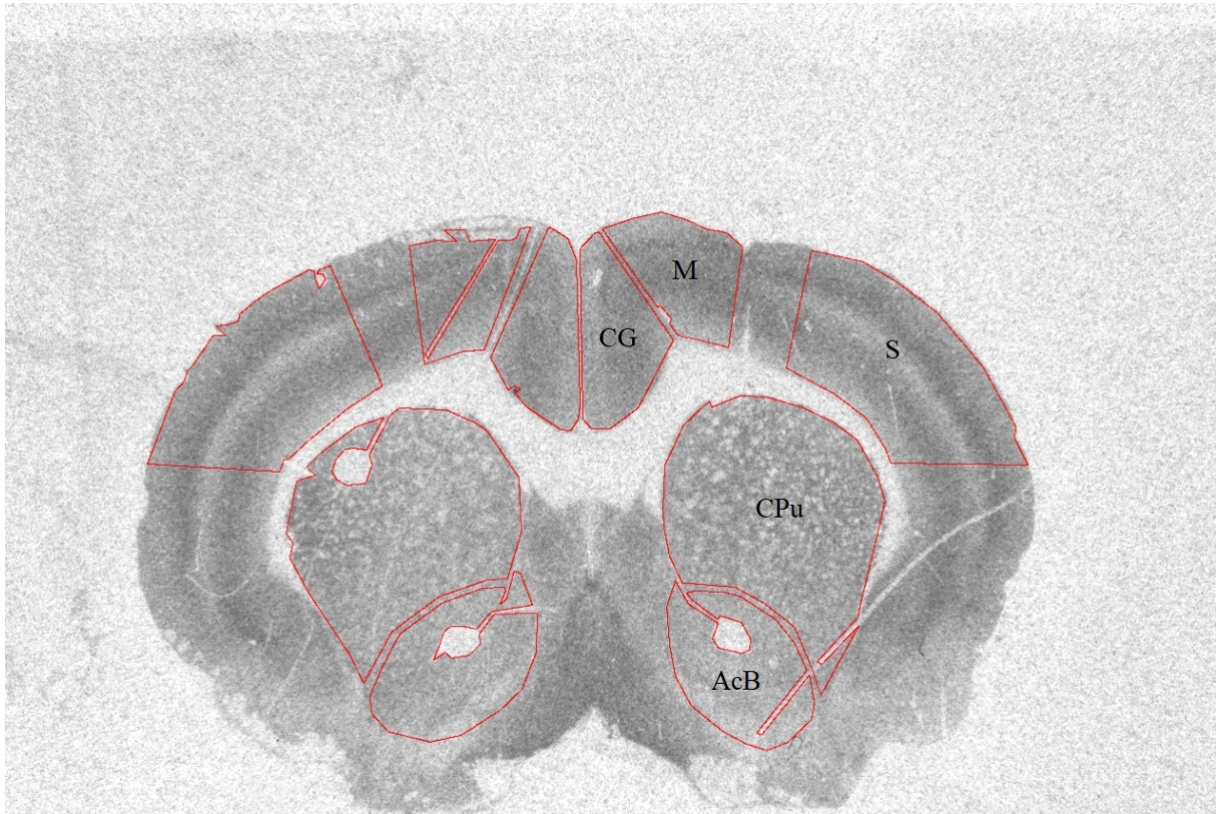


Abbildung 4 Rezeptorautoradiogramm eines rostralen Frontalschnittes des Rattenhirns (Schnitt 1) mit beidseits rot eingerahmten Hirnarealen. Größere Artefakte wurden dabei ausgespart und nicht eingerahmt. Rechtshemisphärisch wurden die gemessenen Hirnareale beschriftet. CG = cingulärer Kortex, M = motorischer Kortex, S = sensorischer Kortex, Cpu = Striatum, AcB = Nucleus accumbens.

Bilder mit sehr stark beschädigten Arealen wurden aus der Messreihe genommen. Auf diese Weise wurde ebenfalls verfahren, wenn die Areale aufnahmebedingt unscharf waren.

Insgesamt wurden 12 verschiedene Regionen gemessen, wobei nicht alle Regionen bei jedem Rezeptor gemessen wurden. Nur, wenn der Rezeptor in der jeweiligen Region exprimiert wird, wurde eine Messung durchgeführt.

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2) sind die einzelnen Rezeptoren mit den jeweils gemessenen Hirnregionen aufgeführt.

Tabelle 2 Übersicht der Rezeptoren mit den jeweils gemessenen Hirnregionen.

Rezeptor	Ligand	AcB	CA1	CA3	CG	CPu	DG	SN	GP	Tul	STN	M	S
mACh: M ₁	Pirenzipin	x	x		x	x	x		x			x	x
mACh: M ₂ (Antagonist)	AF-DX384	x	x		x	x	x	x	x			x	x
mACh M ₂ (Agonist)	Oxotremorin	x	x		x	x	x	x	x			x	x
mACh: M ₃	4-DAMP	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x
nACh	Epibatidin	x	x		x	x	x		x			x	x
KAINAT	Kainat	x	x	x	x	x	x		x			x	x
NMDA	MK801	x	x	x	x	x	x		x			x	x
mGlu _{2/3}	LY341,495	x	x	x	x	x	x		x			x	x
5HT _{2A}	Ketanserin	x	x		x	x	x	x	x			x	x
D ₁	SCH23390	x				x		x	x	x			
GABA A	Muscimol	x	x		x	x	x	x	x			x	x
GABA A mit BZ-BS	Flumanzenil	x	x		x	x	x	x	x			x	x
GABA B	CGP52626	x	x		x	x	x	x	x			x	x
A ₁	DPCPX+Gpp	x	x		x	x	x	x	x			x	x
α ₁	Prazosin	x	x		x	x	x	x	x			x	x
α ₂	UK14,304	x	x		x	x	x	x	x			x	x

2.7 Ermittlung der Rezeptordichte

Zur Berechnung der Rezeptordichte wurden die berechneten Kalibrierungskurven, die ligandenspezifische Standardaktivität (SA), die Dissoziationskonstante (Kd) des Liganden und die tatsächliche Konzentration (L) der jeweiligen Liganden während der Inkubation genutzt, um die Grauwerte in die Rezeptordichte (angegeben in fmol/mg Protein) umzuwandeln. SA ist eine Angabe, die die Lieferfirma der Liganden mitteilt. Die Kd des Liganden wird der Literatur entnommen. L wird vor der Inkubation szintigraphisch bestimmt.

Für diesen Vorgang wurde folgende Gleichung genutzt:

$$\text{Rezeptordichte} \left[\frac{\text{fmol}}{\text{mg}} \text{Protein} \right] = \frac{\text{Grauwert (CG)}}{\text{SA [Ci/mmol]}} * \frac{\text{Kd} + \text{L [nM]}}{\text{L [nM]}}$$

Tabelle 3 Angaben zur verwendeten ligandenspezifischen Standardaktivität (SA), Dissoziationskonstante (Kd) und Realkonzentration (L) der tritiummarkierten Liganden.

Rezeptor	Ligand	SA (Ci/mmol)	Kd (nM)	L (nM)
mACh: M ₁	Pirenzipin	82,3	21,6	10,33
mACh: M ₂ (Antagonist)	AF-DX384	106,5	5,2	5,07
mACh: M ₂ (Agonist)	Oxotremorin	78,6	1,7	1,65
mACh: M ₃	4-DAMP	80,3	1	0,98
nACh	Epibatidin	55,8	0,11	0,11
KAINAT	Kainat	49,9	9,4	9,54
NMDA	MK801	22,5	3,3	3,3
mGlu _{2/3}	LY341,495	40	1	1,01
5HT _{2A}	Ketanserin	53,4	1,14	1,14
D ₁	SCH23390	85	1,67	1,72
GABA A	Muscimol	35,6	7,7	7,74
GABA A _{mit BZ-BS}	Flumanzenil	78,8	1,67	0,94
GABA B	CGP52626	30	2	2,05
A ₁	DPCPX+Gpp	120	1	0,82
α1	Prazosin	85,3	0,09	0,09
α2	UK14,304	54,1	0,64	0,63

2.8 Statistik

Die statistische Betrachtung der jeweiligen Rezeptordichten erfolgte mit Hilfe der Software IBM SPSS Statistics (Version 20.0). Eine Gaußsche-Verteilung der Rezeptordichte-Werte wurde mit dem Kolmogorow-Test geprüft. Die Datenanalyse fand mittels der post-hoc ANOVA Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur statt. Der Wert $p < 0.05$ wurde dabei als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Messergebnisse der ligandenspezifischen Rezeptordichten der einzelnen Hirnareale beschrieben. Neben den Strukturen der Basalganglien wurden weitere Hirnareale gemessen, die nicht Bestandteile der Basalganglien sind, aber für die Interpretation der Auswirkungen einer intrastriatalen BoNT-A Injektion theoretisch von Interesse sein könnten. Zu diesen Arealen gehören einige Kortexareale wie der cinguläre Kortex (CG) und der somatosensorische Kortex (S). Des Weiteren wurden Areale des Hippocampus (Teile des Cornu ammonis (CA1 und CA3) und des Gyrus dentatus (DG)) rezeptorautoradiographisch gemessen. Die Strukturen der Basalganglien werden hier wie folgt abgekürzt: Substantia nigra (SN), Nucleus accumbens (AcB), Striatum der Ratte (CPu), Globus pallidus (GP). Für die Darstellung der Ergebnisse wurde für jeden Rezeptor eine falschfarben-kodierte Abbildung der Verteilung der Rezeptordichte eines Kontrolltieres der Ebene 1 erstellt. In der Ebene 1 wurden jeweils die Hirnareale CPu, AcB, CG, M und S gemessen. Des Weiteren wurde für jeden Liganden/Rezeptor ein Säulendiagramm mit den mittleren flächengewichteten Rezeptordichten aller einzeln gemessenen Hirnregionen erstellt. Dargestellt werden jeweils die interhemisphärischen Rezeptordichten für eine native Kontrollgruppe (K) und eine Gruppe nativer Ratten, welchen BoNT-A in das rechte Striatum injiziert wurde (B). Die Anzahl der Tiere der Kontrollgruppe betrug sieben Tiere. Die Gruppe der BoNT-A behandelten Tiere umfasste 33 Ratten. Die deutlich höhere Gruppengröße B ergibt sich daraus, dass in der Gruppe B verschiedene Überlebensgruppen untersucht wurden (drei Wochen bis neun Monate). Da sich für keinen der Rezeptoren ein signifikanter Einfluss der Überlebenszeiten nach der BoNT-A-Applikation in den untersuchten Hirnregionen zeigte, wurden die zeitlichen Untergruppen gepoolt und sind im Folgenden nicht dargestellt.

3.1 M₁-Rezeptor

Die folgende Abbildung 5 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des M₁-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. In der Ebene 1 wurden die Hirnareale S, M, CG, CPu und AcB gemessen. Mit über 7000 fmol/mg Protein ist der M₁-Rezeptor im AcB am stärksten vertreten. Im S fällt die Rezeptordichte, unter allen gemessenen Hirnarealen in der Ebene 1, am geringsten aus. Allgemein weisen die Rezeptordichten große arealspezifische Unterschiede im Bereich von 350-7000 fmol/mg Protein auf.

Die Abbildung 5 B zeigt eine graphische Darstellung der mittleren flächengewichteten Rezeptordichte der einzelnen links-, sowie rechtshemisphärischen Hirnregionen (aller gemessenen Ebenen) für die Gruppen K und B. Die Rezeptordichte des muskarinischen ACh-Rezeptors M₁ wurde mit Hilfe des Liganden Pirenzipin gemessen. Im AcB und im Hippocampus (CA1 und DG) liegen die Dichtewerte relativ seitengleich konstant um die 7000 fmol/mg Protein. In den Kortexarealen (CG, M, S) und im CPu liegt sie im Schnitt um die 4000 fmol/mg Protein. Eine sehr geringe Rezeptordichte mit ca. 350 fmol/mg Protein wurde im GP ermittelt.

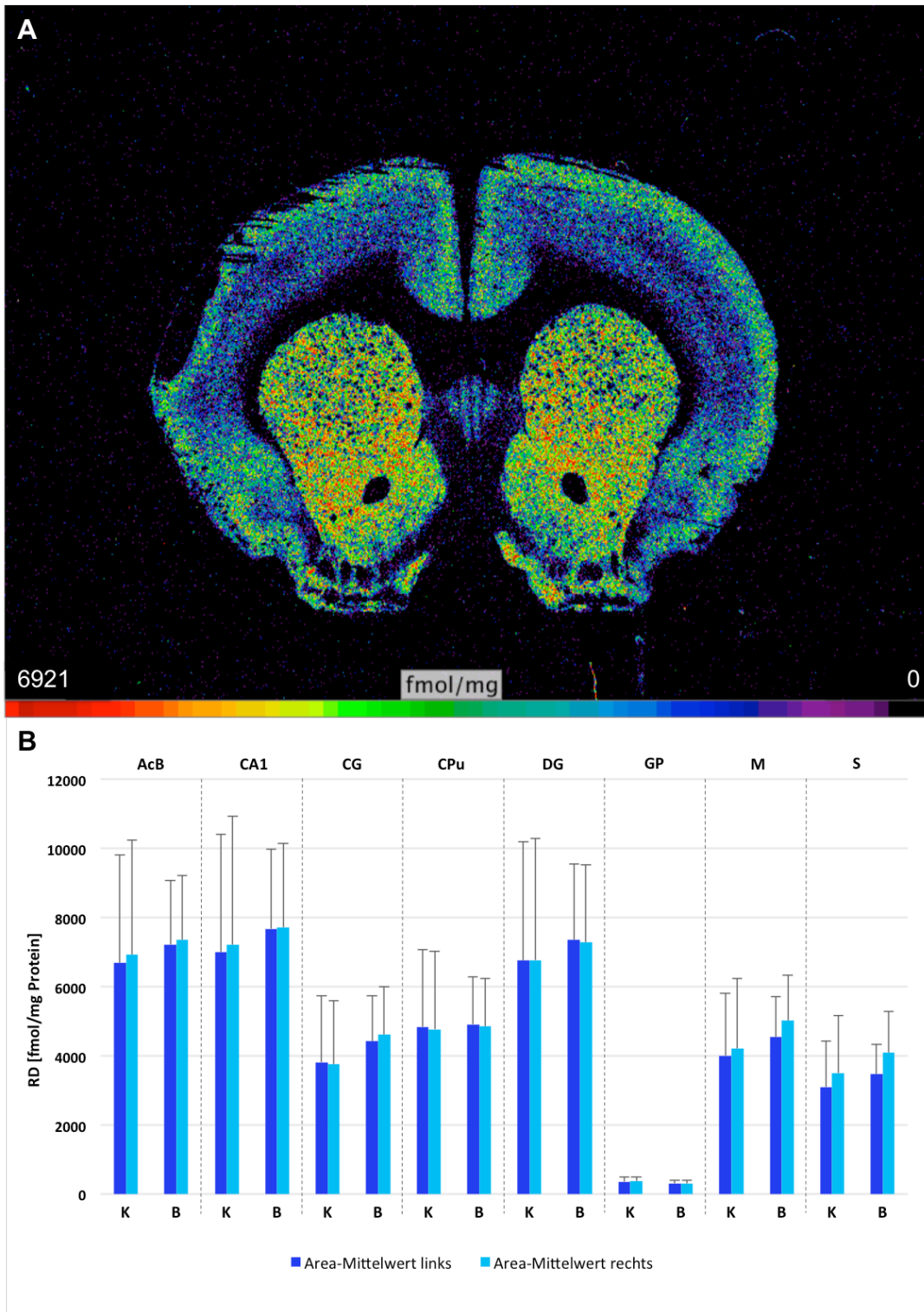


Abbildung 5 Ergebnisse des M_1 -Rezeptors **A)** Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. **B)** Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (native Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.2 M₂ (Antagonist)-Rezeptor

Die Abbildung 6 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des M₂(Antagonist)-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. In der Ebene 1 wurden die Hirnareale S, M, CG, CPu und AcB gemessen. Die Rezeptordichten weisen große arealspezifische Unterschiede auf.

In Abbildung 6 B sind die mittleren flächengewichteten Rezeptordichten der gemessenen Hirnareale (aller gemessenen Ebenen) der linken und der rechten Hemisphäre der K- und der B-Gruppe für den mAChR M₂-Rezeptor graphisch dargestellt. Die Rezeptordichte des muskarinischen ACh-Rezeptors M₂(Antagonist) wurde mit Hilfe des Liganden AF-DX384 gemessen. In den Kortexarealen (CG, M und S) und im CA1 zeigt sich mit einer durchschnittlichen Rezeptordichte von 1900 fmol/mg Protein eine sehr ähnliche Rezeptorexpression. Im CPu und AcB liegt sie mit durchschnittlich 3200 fmol/mg Protein etwas höher, wohingegen in der SN und im GP eine eher geringe Rezeptordichte herrscht. Innerhalb der Gruppen stellen sich interhemisphärisch kaum Unterschiede dar. Lediglich im CPu und im S zeigt sich zwischen der linken und der rechten Hemisphäre in der B Gruppe ein Unterschied, welcher als signifikant gewertet wird. Im CPu ist die mittlere Rezeptordichte nach der BoNT-A-Injektion rechts etwas niedriger als in der unbehandelten linken Hemisphäre. Im somatomotorischen Kortex ist nach der BoNT-A-Gabe die Rezeptordichte leicht erhöht. Dies hat sich allerdings nicht als signifikant herausgestellt.

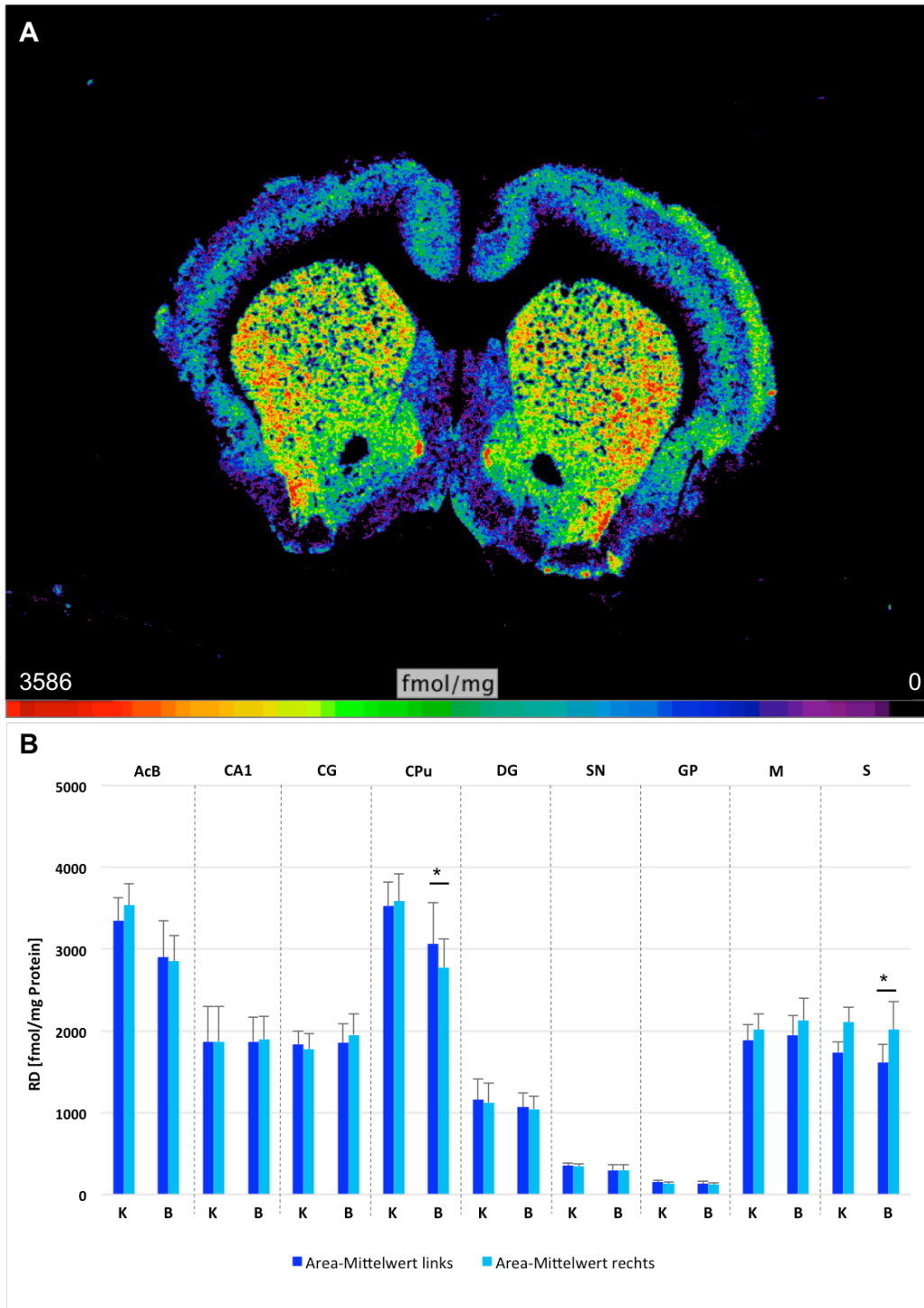


Abbildung 6 Ergebnisse des M_2 (Antagonist)-Rezeptors **A)**Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene I. **B)** Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), SN (=Substantia nigra), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.3 M₂(Agonist)-Rezeptor

Die Abbildung 7 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des M₂(Agonist)-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. In der Ebene 1 wurden die Hirnareale S, M, CG, CPu und AcB gemessen. Die Rezeptordichten weisen arealspezifische Unterschiede auf. Die Rezeptordichte des M₂(Agonist)-Rezeptors ist in den Kortexarealen (M, S und CG) am größten. Hier wurden Werte über 1000 fmol/mg Protein gemessen, während die Rezeptordichte im AcB und CPu zwischen 750 fmol/mg Protein und 900fmol/mg Protein liegt.

In Abbildung 7 B sind die mittleren Rezeptordichten für die gemessenen Hirnareale (aller gemessenen Areale) der linken und rechten Hemisphäre der K-Gruppe und der B-Gruppe graphisch dargestellt. Die Rezeptordichte des muskarinischen ACh-Rezeptors M₂(Agonist) wurde mit Hilfe des Liganden Oxotremorin gemessen. Im AcB, in der CA1-Region und im CPu wurde im Durchschnitt eine mittlere Rezeptordichte von ungefähr 790 fmol/mg Protein gemessen. Der GP weist mit rund 70 fmol/mg Protein sehr geringe Rezeptordichtewerte auf. Wohingegen in den gemessenen Kortexarealen (M, S, CG) eine höhere mittlere Rezeptordichte von ca. 1250 fmol/mg Protein ermittelt wurde. Zwischen den beiden Hemisphären stellen sich weder bei der B-Gruppe, noch bei der K-Gruppe signifikante Unterschiede in der Rezeptordichte dar.

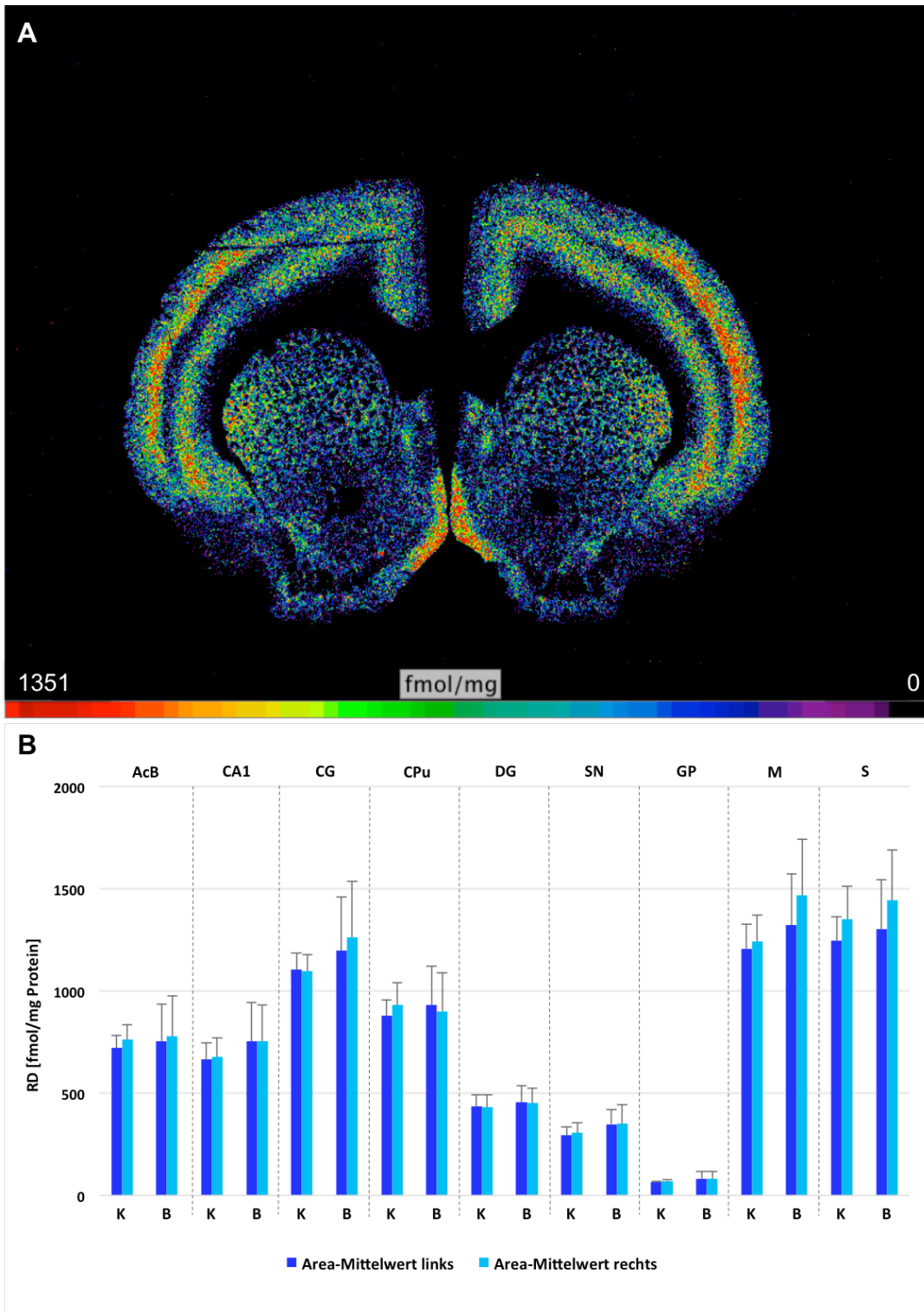


Abbildung 7 Ergebnisse des $M_2(\text{Agonist})$ -Rezeptors **A**) Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. **B**) Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), SN (=Substantia nigra), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben

3.4 M₃-Rezeptor

Die Abbildung 8 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des M₃-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. In der Ebene 1 wurden die Hirnareale S, M, CG, CPu und AcB gemessen. In all diesen Regionen herrscht mit Werten zwischen ca. 6000 und 8000 fmol/mg Protein eine relativ hohe Rezeptordichte. Auffällig ist hier, dass die Rezeptordichten im AcB und CPu höher sind als in den Kortexarealen (S, M und CG).

In der Abbildung 8 B ist die mittlere flächengewichtete Rezeptordichte der einzelnen gemessenen Hirnregionen (aller gemessenen Ebenen) der linken und der rechten Hemisphäre der K-Gruppe und der B-Gruppe graphisch dargestellt. Der muskarinische ACh-Rezeptor M₃ wurde hier mit Hilfe des Liganden 4-DAMP nachgewiesen. Im Gegensatz zu den anderen muskarinischen Rezeptoren wurde der M₃-Rezeptor auch im STN nachgewiesen. Allgemein ist auffällig, dass die Rezeptordichten große arealspezifische Unterschiede aufweisen. Im STN, GP und in der SN herrscht mit einem Durchschnitt von ca. 700 fmol/mg Protein eine nur sehr geringe Rezeptordichte. In den anderen gemessenen Hirnarealen liegt die Rezeptordichte des M₃-Rezeptors mindestens immer über 5000 fmol/mg Protein. Zwischen den beiden Hemisphären stellen sich weder bei der B-Gruppe, noch bei der K-Gruppe signifikante Unterschiede in der Rezeptordichte dar.

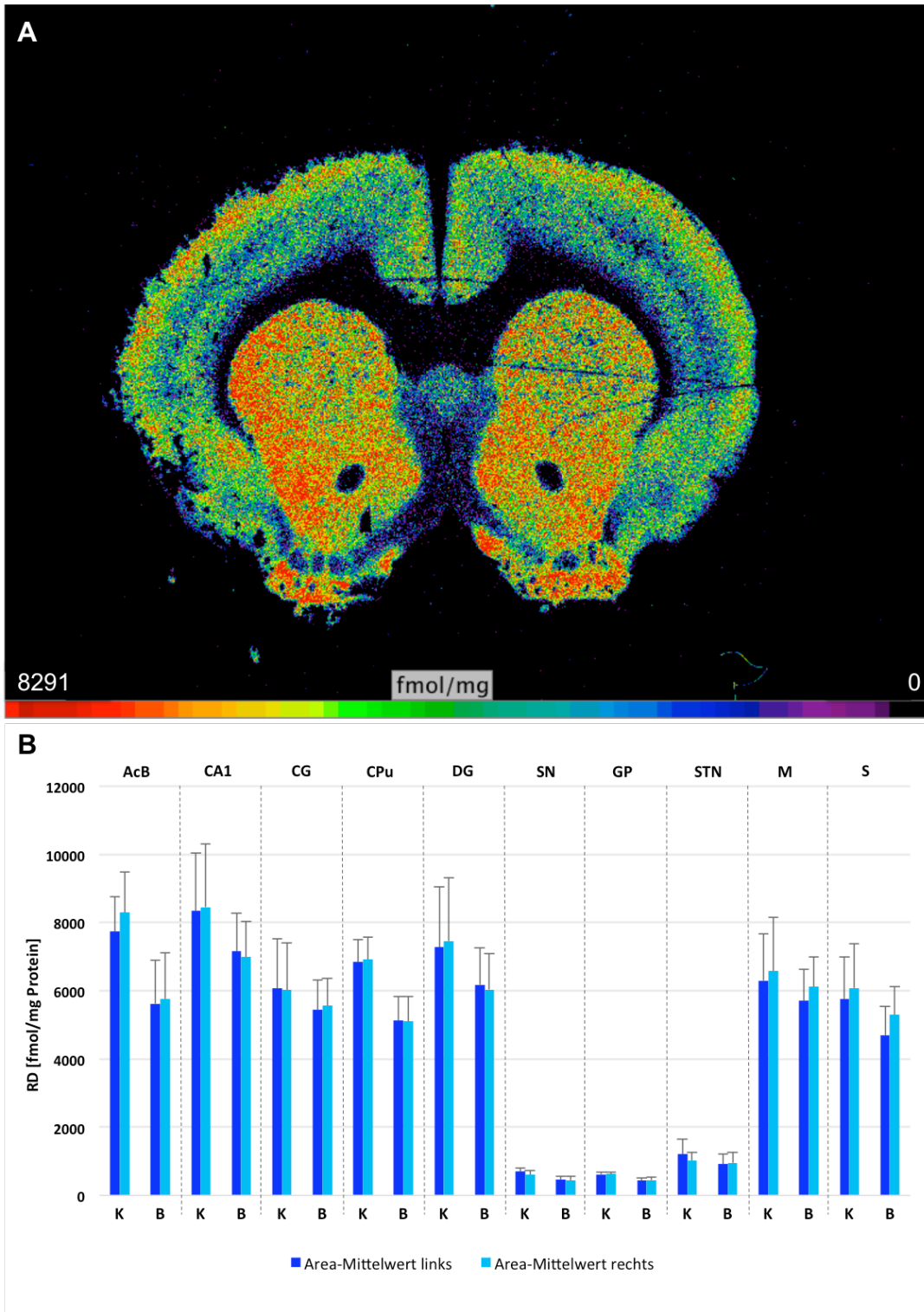


Abbildung 8 Ergebnisse des M_3 -Rezeptors **A)** Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. **B)** Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), SN (=Substantia nigra), GP (=Globus pallidus), STN (=Nucleus subthalamicus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.5 nACh-Rezeptor

Die Abbildung 9 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des nACh-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Allgemein ist der nACh-Rezeptor, im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren, in allen gemessenen Hirnregionen, nur mit einer sehr geringen Dichte vertreten. Die Werte liegen alle unter 500 fmol/mg Protein.

Die Abbildung 9 B zeigt die mittlere flächengewichtete Rezeptordichte der einzelnen links- sowie rechtshemisphärischen Hirnregionen (aller gemessenen Ebenen) für die Gruppen K und B. Der nACh-Rezeptor wurde mit Hilfe des Liganden Epibatidin nachgewiesen. Es zeigt sich eine deutlich arealspezifische Rezeptorverteilung. Während in den Arealen AcB, CG, CPu, M und S relativ ähnliche Rezeptordichten festgestellt wurden, weisen der Hippocampus und der GP eher geringe Rezeptordichten auf.

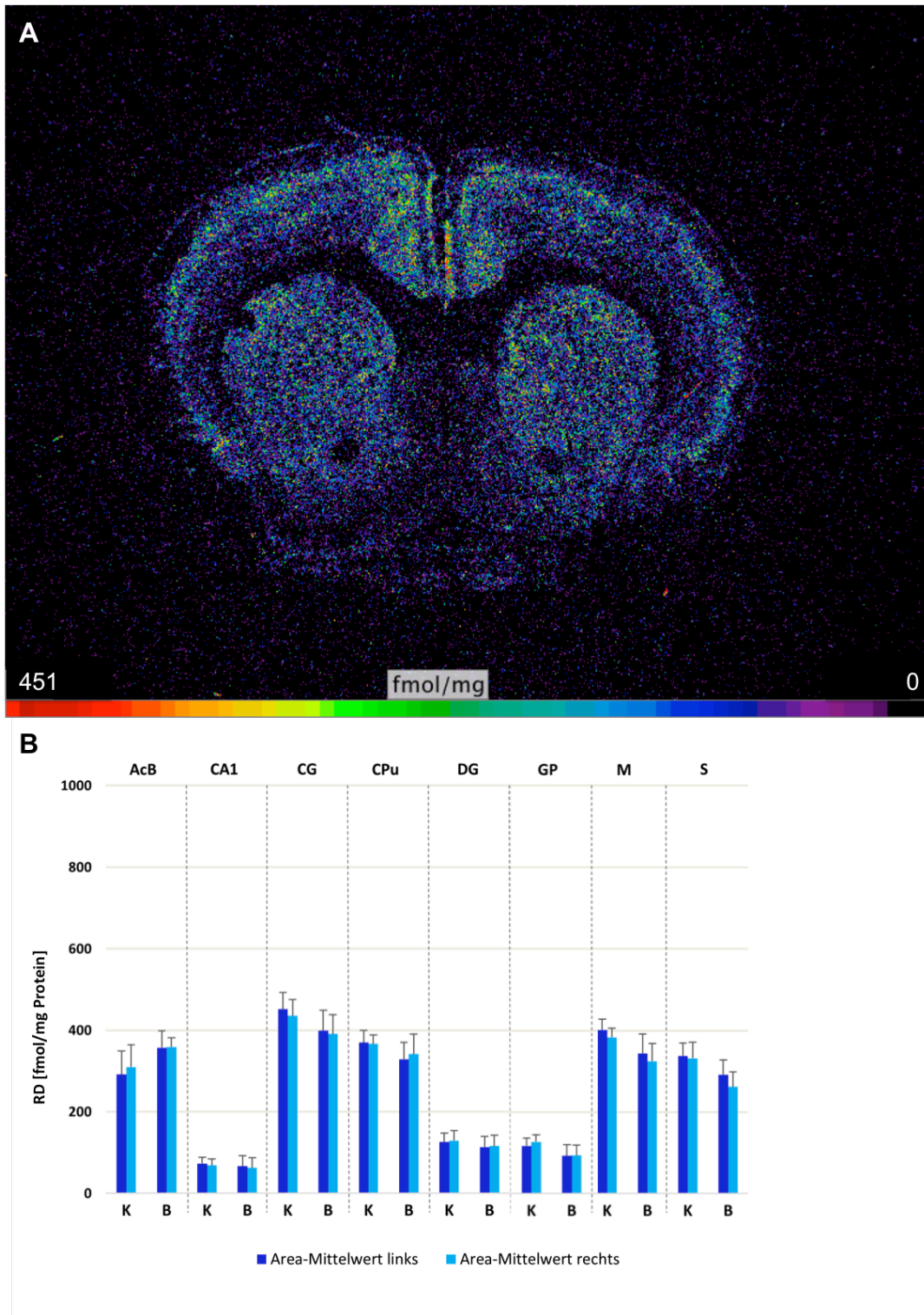


Abbildung 9 Ergebnisse des nACh-Rezeptors **A)** Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. **B)** Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), fr (=Formatio reticularis), GP (=Globus pallidus), Lhb (=laterale Habenula), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.6 Kainat-Rezeptor

Die Abbildung 10 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des Kainat-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Die Rezeptordichte ist im AcB und CPu am höchsten. Unter den rezeptorautoradiographisch gemessenen Kortexarealen liegt die Dichte des Kainat-Rezeptors im CG am höchsten.

In Abbildung 10 B sind die Rezeptordichten der linken und der rechten Hemisphäre (aller gemessenen Ebenen) der Versuchsgruppen K und B jeweils als gewichtete Mittelwerte graphisch dargestellt. Die Rezeptordichte wurde mit Hilfe des gleichnamigen Liganden gemessen. In den gemessenen Hirnarealen AcB, CA3, CG, CPu und M liegen die mittleren Rezeptordichten über 1000 fmol/mg Protein. In den Hirnarealen CA1 und GP wurden mit Werten, unter 500 fmol/mg Protein, nur halb so viele Kainat Rezeptoren nachgewiesen. Die Rezeptordichte zeigt weder bei den Kontrollgruppen, noch bei den mit BoNT-A-injizierten Gruppen, relevante Unterschiede zwischen der unbehandelten linken und der behandelten rechten Hemisphäre.

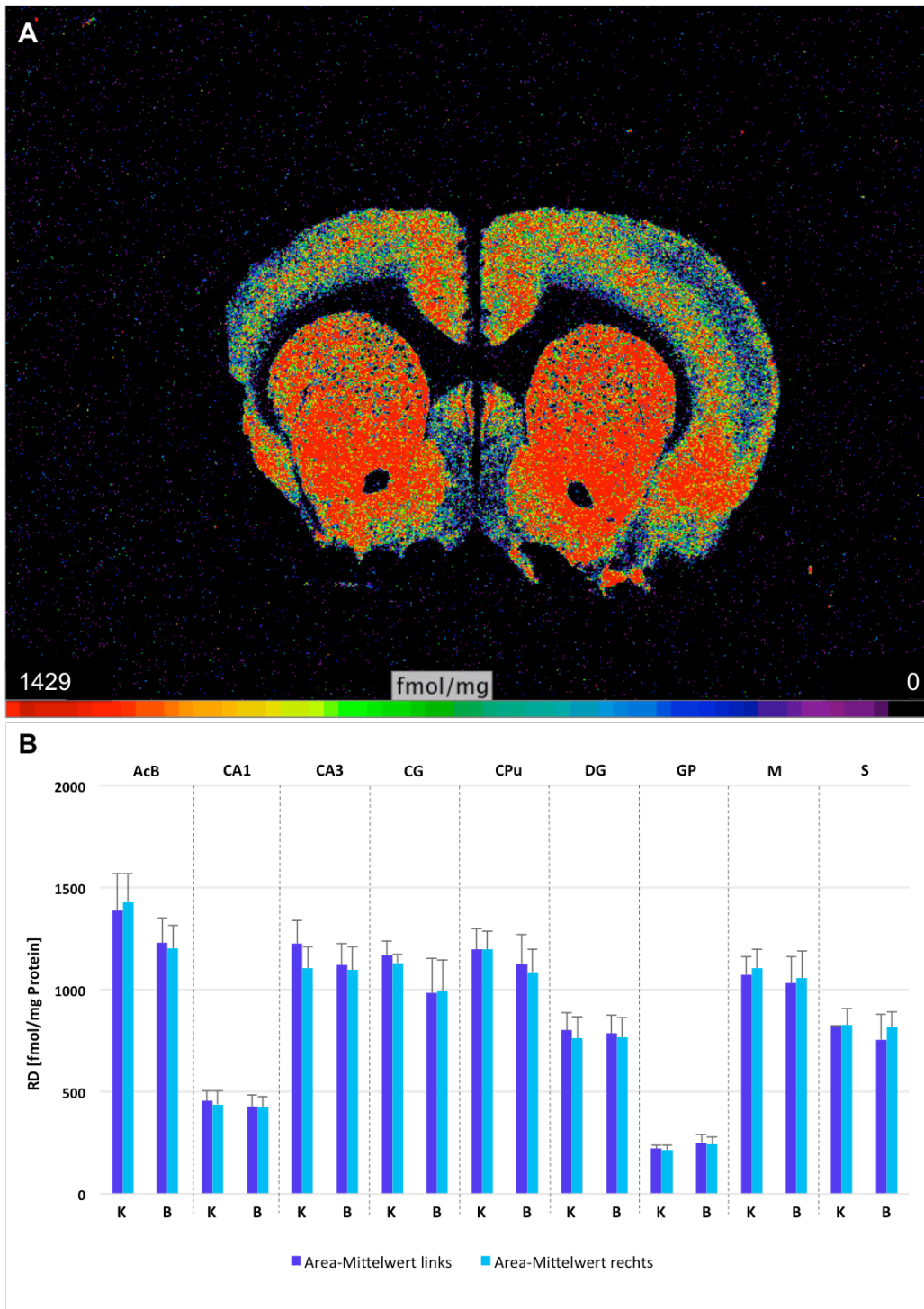


Abbildung 10 Ergebnisse des Kainat-Rezeptors **A**) Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. **B**) Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1, CA3 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.7 NMDA-Rezeptor

Die Abbildung 11 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des NMDA-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Es zeigen sich deutlich arealspezifische Unterschiede. Die rezeptorautoradiographische Messung zeigt, dass der NMDA-Rezeptor größtenteils im Isokortex und Allokokortex exprimiert wird.

Für den NMDA-Rezeptor wurden mittels des Liganden MK801 die Rezeptordichten der Gruppen K und B links- sowie rechtshemisphärisch gemessen. Die Ergebnisse sind als mittlere flächengewichtete Dichten im nachstehenden Diagramm (Abbildung 11 B) graphisch dargestellt. Die Rezeptordichten liegen in fast allen gemessenen Arealen über 1000 fmol/mg Protein. Die Messungen zeigen, dass die Rezeptorexpression im Hippocampus, vor allem im CA1, um das Dreifache höher ist als in den anderen gemessenen Hirnregionen. Im GP wurden mit ca. 220 fmol/mg Protein vergleichsweise nur sehr wenige NMDA-Rezeptoren nachgewiesen. Das Diagramm verdeutlicht, dass es zwischen den beiden Hemisphären der untersuchten Gruppen keine Unterschiede gibt. Interhemisphärisch sind die gemessenen Dichtewerte nahezu gleich.

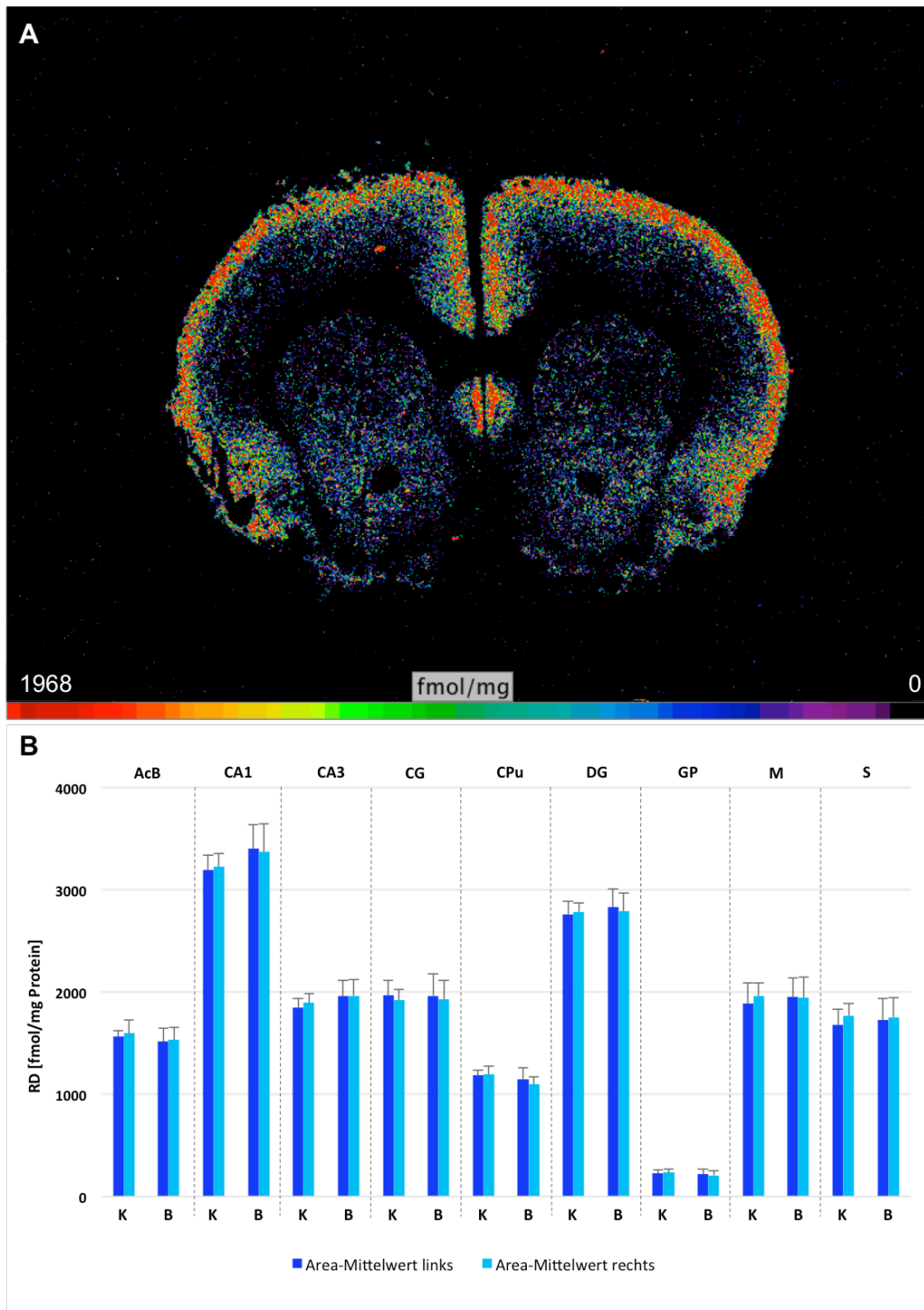


Abbildung 11 Ergebnisse des NMDA-Rezeptors **A)** Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene I. **B)** Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1, CA3 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.8 mGlu_{2,3}-Rezeptor

Die Abbildung 12 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des mGlu_{2,3}-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Die falschfarben-kodierte Abbildung zeigt deutlich, dass der mGlu_{2,3}-Rezeptor besonders stark in den Kortexarealen exprimiert wird.

In Abbildung 12 B sind die mittleren Rezeptordichten für die gemessenen Hirnareale der linken und rechten Hemisphäre (aller gemessenen Ebenen) der K-Gruppe und der B-Gruppe graphisch dargestellt. In den gemessenen Kortexarealen (CG, M und S) wurden mittels des Liganden LY341,495 eine Rezeptordichte von über 4000 fmol/mg Protein nachgewiesen. Im GP wurde dahingegen nur eine geringe Rezeptordichte mit ca. 1250 fmol/mg Protein gemessen. Zwischen der linken und der rechten Hemisphäre gibt es weder bei der Gruppe K, noch bei der Gruppe B signifikante Unterschiede. Die mittleren Rezeptordichten sind in allen Arealen, in den jeweiligen Gruppen, links- sowie rechtshemisphärisch nahezu identisch.

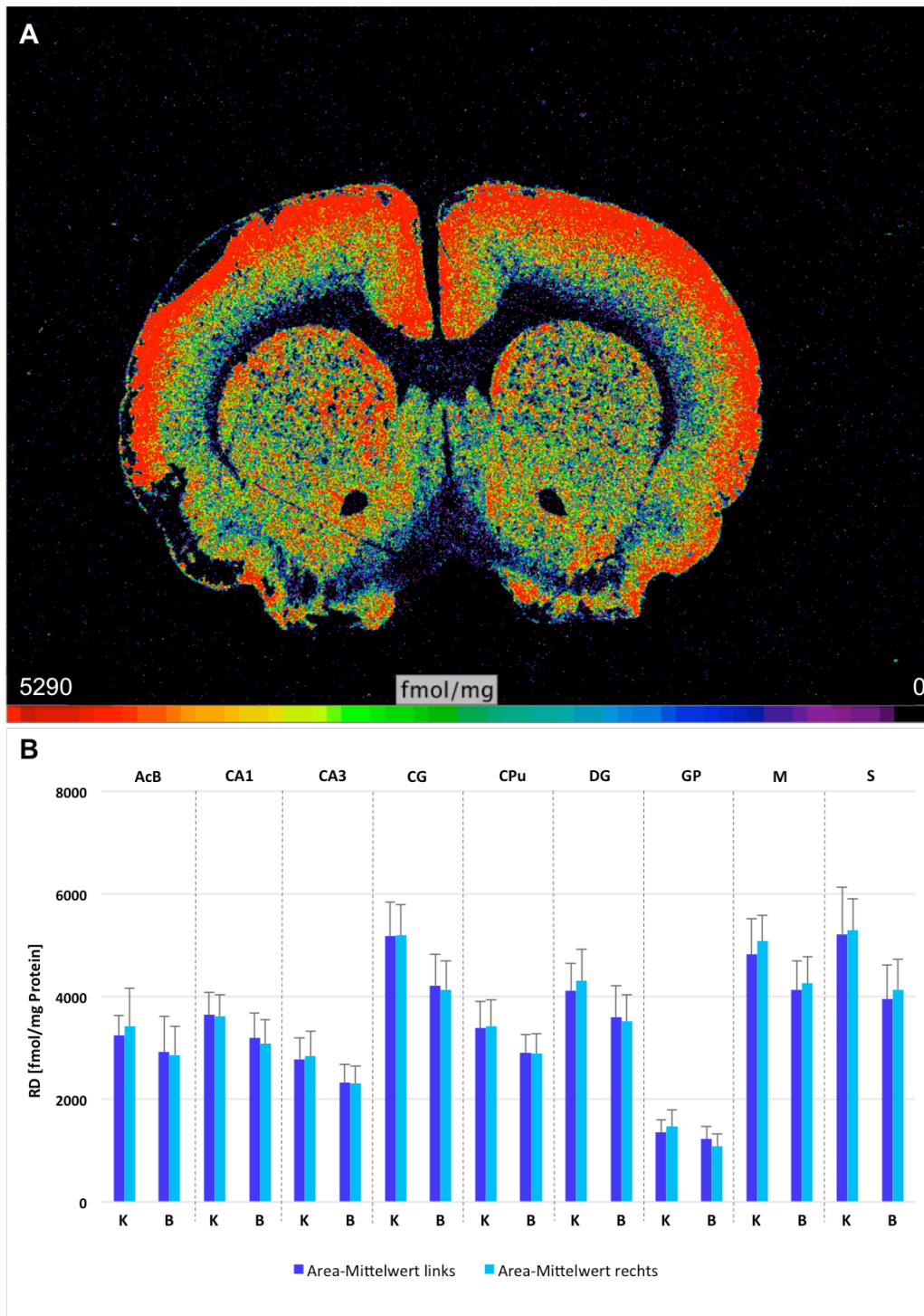


Abbildung 12 Ergebnisse des des $mGlu_{2,3}$ -Rezeptors **A)** Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. **B)** Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1, CA3 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.9 5HT_{2A}-Rezeptor

Die Abbildung 13 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des 5HT_{2A}-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Es zeigen sich deutliche arealspezifische Unterschiede. Die höchste Rezeptordichte, mit fast 1200 fmol/mg Protein, wurde im AcB gemessen, dicht gefolgt vom CPu und den Kortexarealen M, CG und S.

Die flächengewichtete mittlere Rezeptordichte des serotonergen 5HT_{2A}-Rezeptors wurde mit Hilfe des Liganden Ketanserin gemessen und in der nachstehenden Abbildung 13 B graphisch dargestellt. Allgemein ist der 5HT_{2A}-Rezeptor in allen gemessenen Hirnregionen eher gering vertreten. Höhere Rezeptordichten findet man in den Hirnarealen AcB, CG, CPu, M und S. Eher geringe Rezeptordichten, mit durchschnittlich ca. 330 fmol/mg Protein, wurden im CA1, DG, SN und GP gemessen. Weder links- noch rechtshemisphärisch gibt es, hinsichtlich der Rezeptordichte, signifikante Unterschiede.

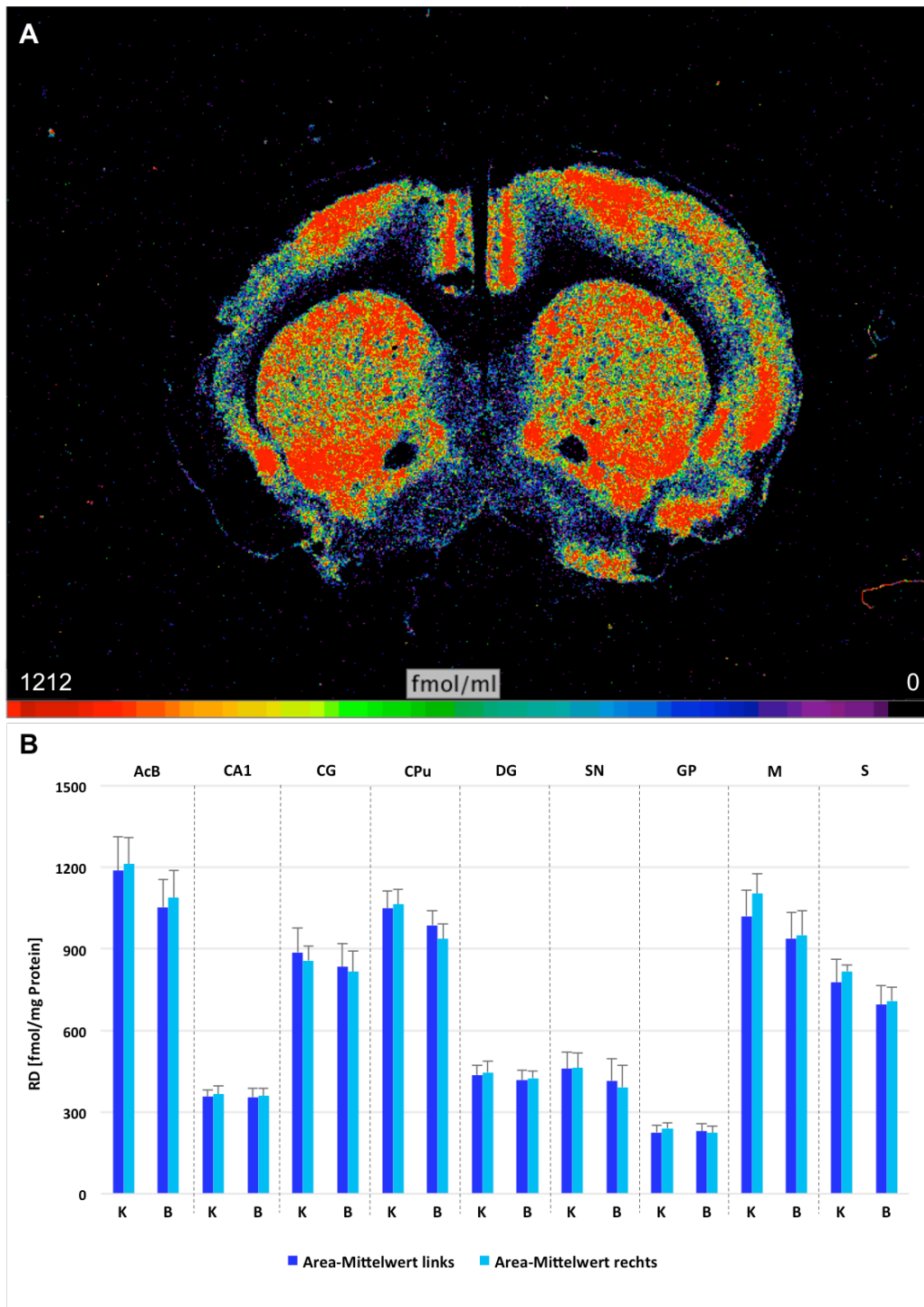


Abbildung 13 Ergebnisse des $5HT_{2A}$ -Rezeptors **A)** Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene I. **B)** Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), SN (=Substantia nigra), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.10 D₁-Rezeptor

Die Abbildung 14 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des D₁-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Die falschfarben-kodierte Abbildung zeigt deutlich, dass der D₁-Rezeptor primär im AcB, CPu und im Tul exprimiert wird.

In der Abbildung 14 B sind, unter Verwendung des Liganden SCH23390, die Rezeptordichten der linken und der rechten Hemisphäre der Versuchsgruppen K und B (aller gemessenen Ebenen) jeweils als gewichtete Mittelwerte graphisch dargestellt. Der D₁-Rezeptor wurde in den Hirnarealen AcB, CPu, SN, GP und Tul nachgewiesen. Die Rezeptordichte ist mit durchschnittlich 1900 fmol/mg Protein im AcB, CPu und Tul am höchsten. Werte von ca. 500 fmol/mg Protein verdeutlichen, dass die Expression des D₁-Rezeptors im GP relativ gering ist. In der mit BoNT-A behandelten Gruppe B liegen die mittleren Rezeptordichten im Bereich der Kontrollgruppen. Die Rezeptordichte der BoNT-A injizierten rechten Hemisphäre weist keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten linken Hemisphäre auf.

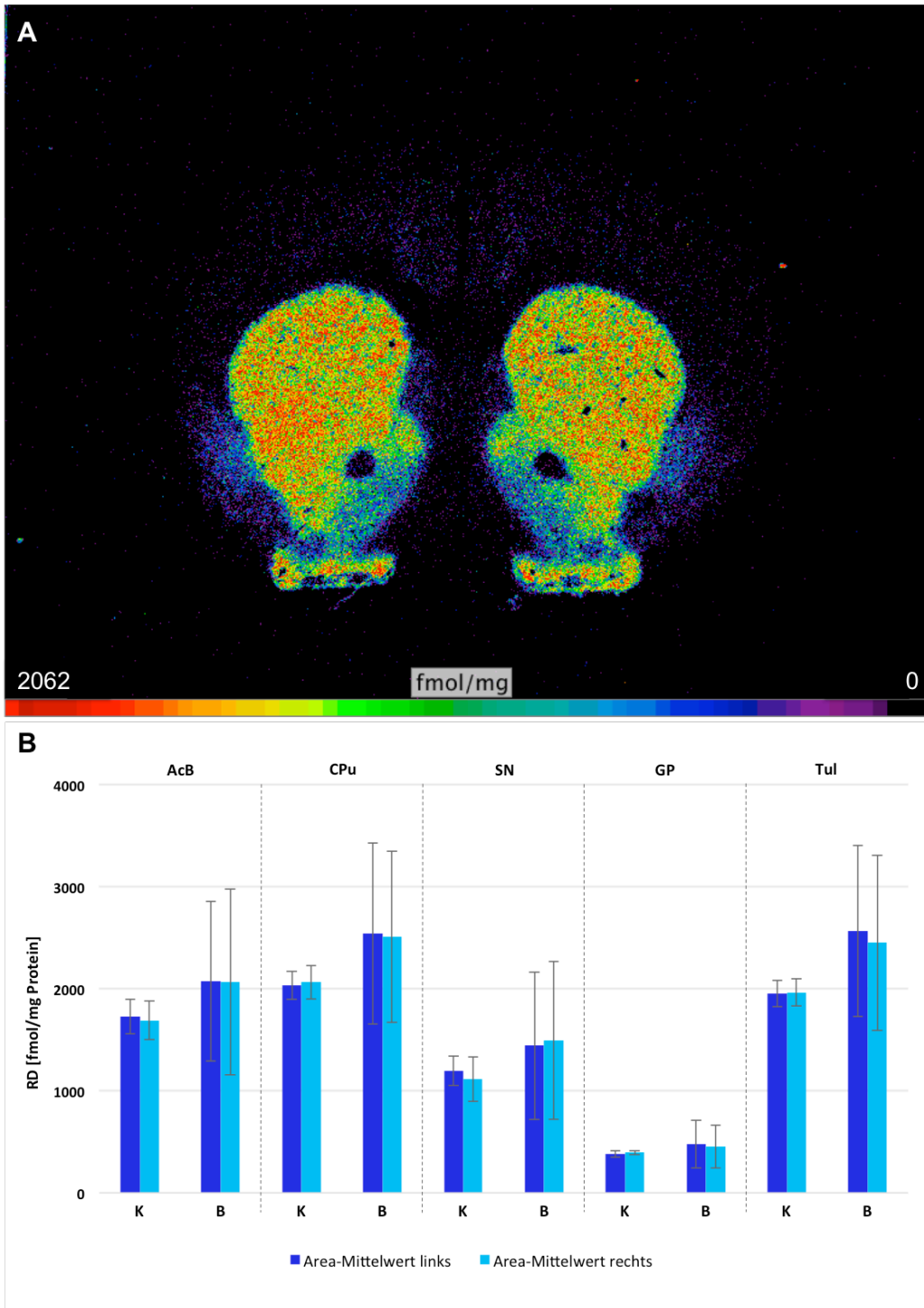


Abbildung 14 Ergebnisse des D_1 -Rezeptors **A)** Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene I. **B)** Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CPu (=Striatum), SN (=Substantia nigra), GP (=Globus pallidus), Tul (=Tuberculum olfactorium) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.11 GABA A-Rezeptor

Die Abbildung 15 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des GABA A-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Es zeigen sich deutliche arealspezifische Unterschiede. Der GABA A-Rezeptor konnte besonders im Isokortex und Allokokortex nachgewiesen werden.

Die Rezeptordichten der linken und der rechten Hemisphäre wurden mit Hilfe des Liganden Muscimol gemessen. Die Ergebnisse sind als mittlere flächengewichtete Dichten im nachstehenden Diagramm (Abbildung 15 B), jeweils für die Gruppe K und B, graphisch dargestellt. Die höchste Rezeptordichte wurde in den Kortexarealen (CG, M und S) mit durchschnittlich 2300 fmol/mg Protein gemessen. Die mittleren Rezeptordichten fallen im AcB, CPu und GP mit ca. 900 fmol/mg Protein geringer aus. Interhemisphärisch wurden keine Signifikanzen festgestellt, weder in der K- noch in der B-Gruppe.

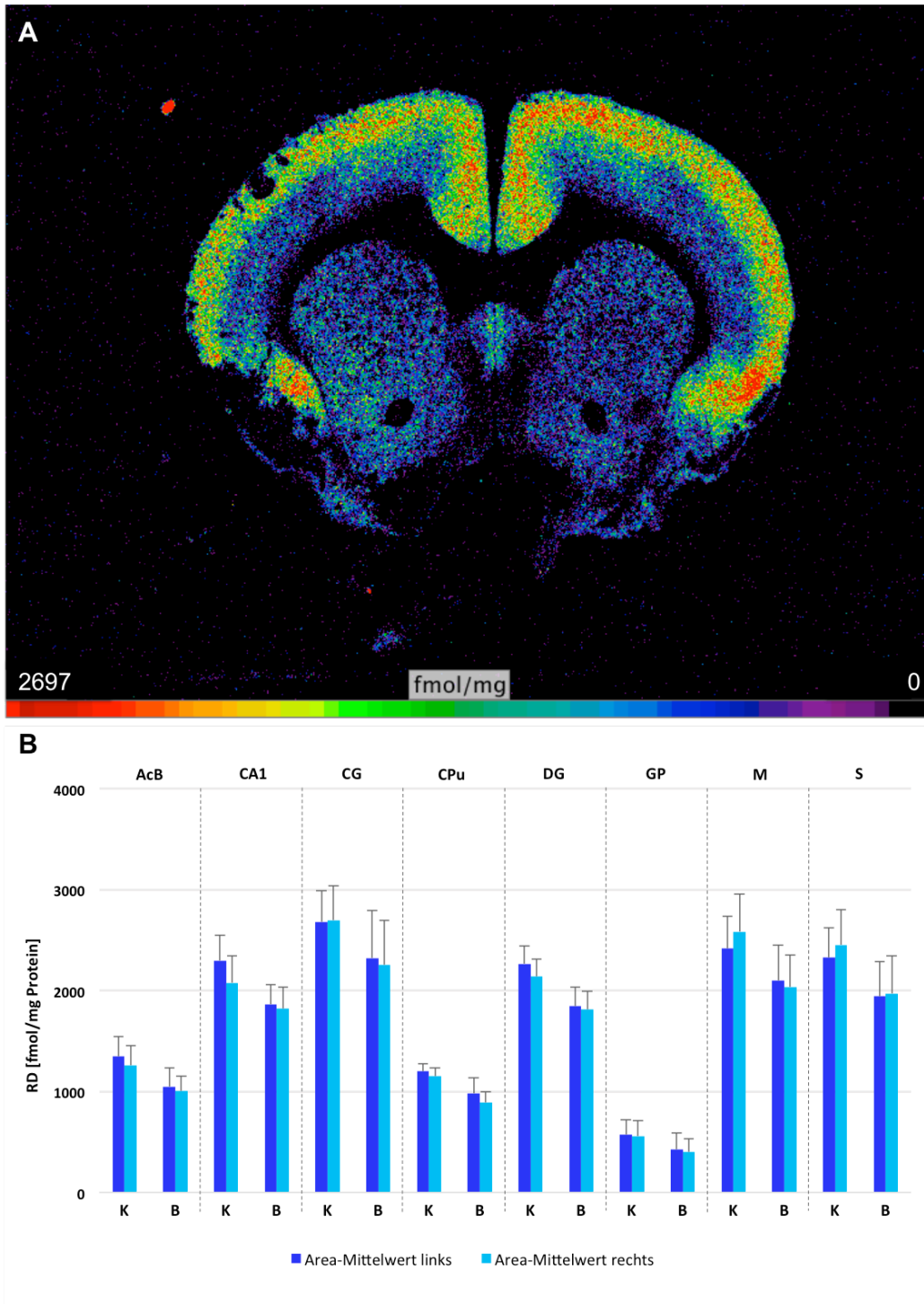


Abbildung 15 Ergebnisse des GABA A-Rezeptors **A)** Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene I. **B)** Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.12 GABA A-Rezeptor mit Benzodiazepin-Bindungsstelle

Die Abbildung 16 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des GABA A-Rezeptors mit Benzodiazepin-Bindungsstelle in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Die Rezeptordichte weist große arealspezifische Unterschiede auf. Diese liegen im Bereich von 1000 - 5400 fmol/mg Protein. In Abbildung 16 B sind die Rezeptordichten der linken und der rechten Hemisphäre (aller gemessenen Areale) der Versuchsgruppen K und B jeweils als gewichtete Mittelwerte graphisch dargestellt. Diese konnten rezeptorautoradiographisch unter Verwendung des Liganden Flumanzenil ermittelt werden. In den gemessenen Kortexarealen (CG, M und S) liegt die mittlere Rezeptordichte bei durchschnittlich ca. 5000 fmol/mg Protein. Im Hippocampus (CA1, DG) liegt sie mit rund 4000 fmol/mg Protein um 1000 fmol/mg Protein darunter. Mit Rezeptordichten zwischen 1000 und 1500 fmol/mg Protein ist die Rezeptordichte im CPU und SN, unter allen gemessenen Regionen, am geringsten. Die einzelnen Rezeptordichten liegen in der Kruppe K und B links und rechts sehr nahe beieinander. Eine Signifikanz wurde dementsprechend nicht festgestellt.

Vergleicht man die mittleren flächengewichteten Dichten des GABA A-Rezeptors mit Benzodiazepin-Bindungsstelle mit denen des GABA A-Rezeptors ohne Benzodiazepin-Bindungsstelle, fällt auf, dass die Werte des GABA A-Rezeptors mit Benzodiazepin-Bindungsstelle in allen gemessenen Arealen nahezu doppelt so hoch sind.

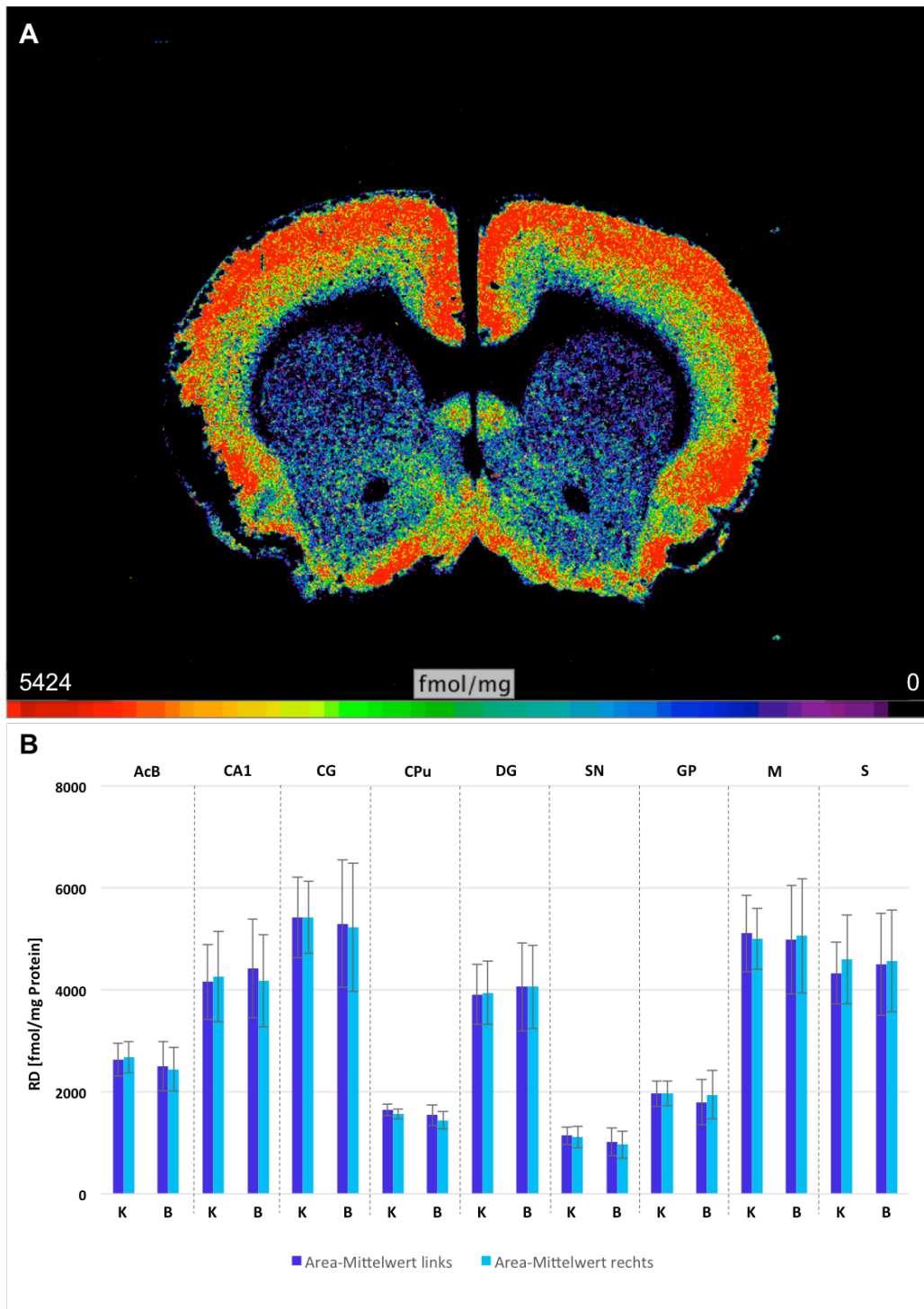


Abbildung 16 Ergebnisse des GABA A-Rezeptors mit Benzodiazepin-Bindungsstelle **A**) Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene I. **B**) Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), SN (=Substantia nigra), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.13 GABA B-Rezeptor

Die Abbildung 17 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des GABA B-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Es zeigen sich arealspezifische Unterschiede. Eine sehr hohe Rezeptordichte konnte besonders in den Kortexarealen nachgewiesen werden. Die höchste flächengewichtete Rezeptordichte mit fast 8000 fmol/mg Protein wurde im CG gemessen.

Die Abbildung 17 B zeigt für den GABA B-Rezeptor die mittleren flächengewichteten Rezeptordichten der einzelnen links- sowie rechtshemisphärischen Hirnregionen (aller gemessenen Ebenen) für die Gruppen K und B. Hierfür wurde der Ligand CGP52626 verwendet. Die Rezeptordichten weisen sehr starke arealspezifische Unterschiede im Bereich von 1500 - 8000 fmol/mg Protein auf. In den gemessenen Kortexarealen (CG, M und S) und im Hippocampus (CA1, DG) liegt die Rezeptordichte über 6000 fmol/mg Protein. In den Hirnregionen SN und GP wurde eine geringere mittlere Rezeptordichte von durchschnittlich ca. 1800 fmol/mg Protein gemessen. Zwischen den beiden Hemisphären gibt es, was die Rezeptordichte angeht, keine Unterschiede. Lediglich in den Kortexarealen M und S wurden in beiden Gruppen in der rechten Hemisphäre eine tendenziell höhere Rezeptordichte des GABA B-Rezeptors nachgewiesen, wobei der größte interhemisphärische Unterschied im Areal S bei der Gruppe K zu verzeichnen ist. Diese Disparität stellt sich aber nicht als signifikant heraus.

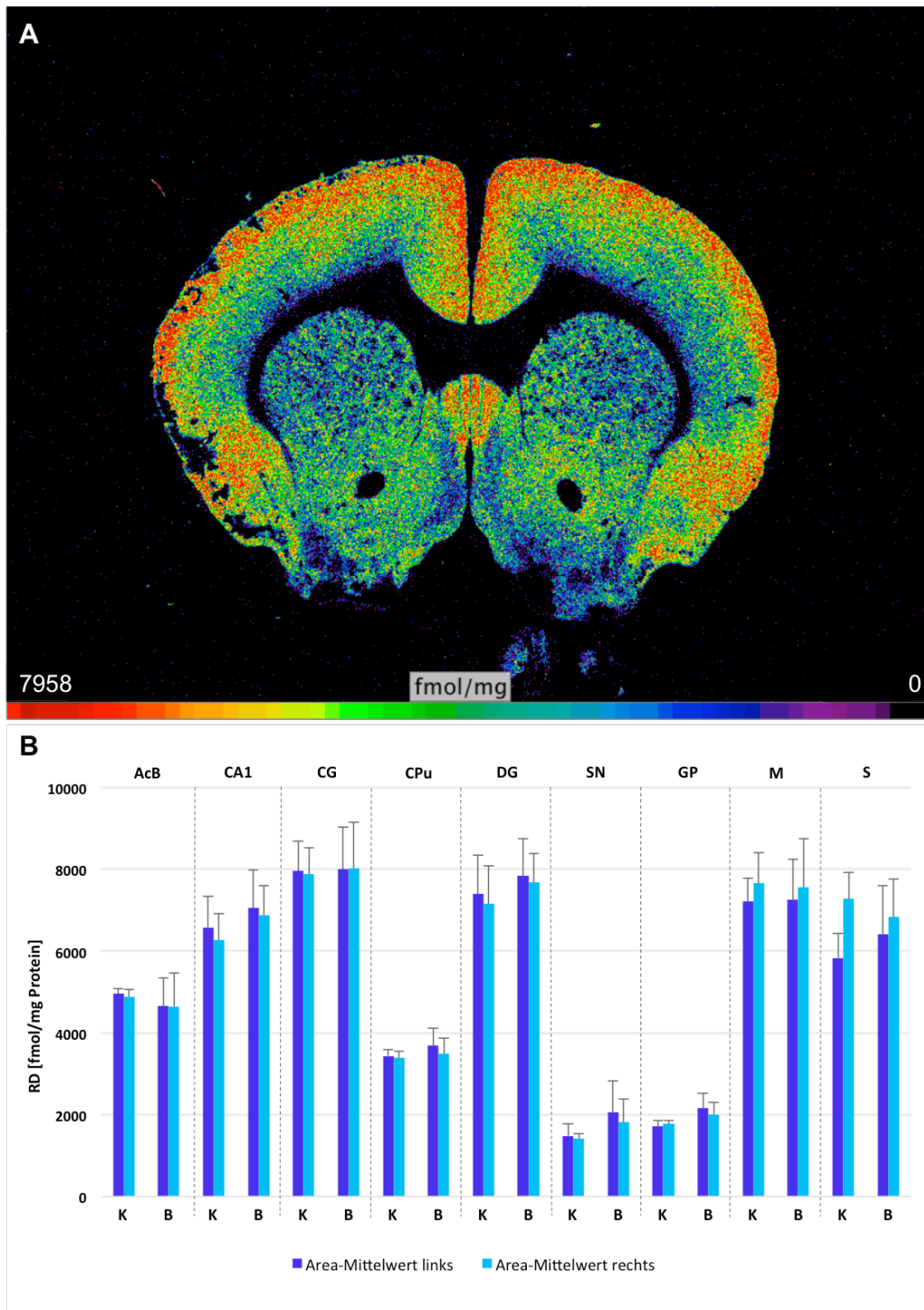


Abbildung 17 Ergebnisse des GABA B-Rezeptors **A)** Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene I. **B)** Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), SN (=Substantia nigra), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.14 A₁-Rezeptor

Die Abbildung 18 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des A₁-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Es zeigen sich arealspezifische Unterschiede.

Die flächengewichtete mittlere Rezeptordichte des Adenosin A₁-Rezeptors wurde mit Hilfe des Liganden DPCPX+Gpp gemessen und im nachstehenden Diagramm (Abbildung 18 B) für die Gruppen K und B graphisch dargestellt. Die rezeptorautoradiographische Messung zeigt, dass der A₁-Rezeptor am stärksten im Hippocampus (CA1, DG) exprimiert wird. Dort liegt die ermittelte Rezeptordichte, unter allen gemessenen Regionen, am höchsten, wobei die größte Rezeptordichte von rund 6600fmol/mg Protein in der CA1 gemessen wurde. Eher niedrige Rezeptordichten (unter 2000fmol/mg Protein) wurden im GP und SN ermittelt. Hinsichtlich der Rezeptordichten wurden interhemisphärisch weder in der K- noch in der B Gruppe Signifikanzen festgestellt.

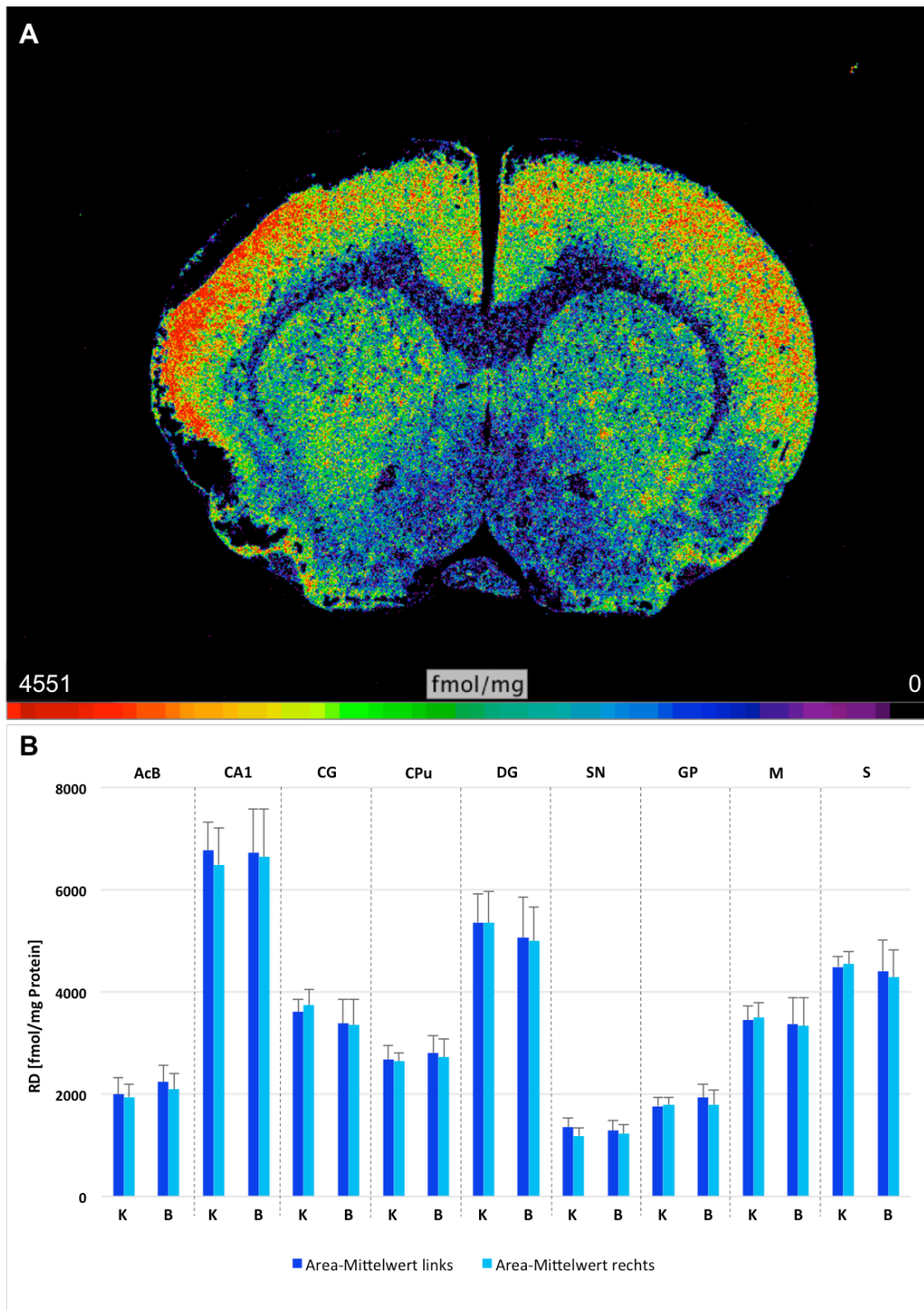


Abbildung 18 Ergebnisse des A_1 -Rezeptors **A)** Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene I. **B)** Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), SN (=Substantia nigra), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.15 α 1-Rezeptor

Die Abbildung 19 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des α 1-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Eine besonders hohe Rezeptordichte konnte vor allem in den Kortexarealen nachgewiesen werden. Unter den drei gemessenen Kortexarealen CG, M und S, wurde besonders im CG und M eine hohe Rezeptorexpression festgestellt.

Die Abbildung 19 B zeigt die mittlere flächengewichtete Dichte der einzelnen links- sowie rechtshemisphärischen Hirnregionen des Adrenozeptors α 1 (Ligand: Prazosin) aller gemessenen Hirnregionen. In der Graphik dargestellt sind jeweils die Rezeptordichten für die Gruppe K und B. Mit Messwerten deutlich unter 700 fmol/mg Protein gehört der α 1-Rezeptor, unter allen gemessenen Rezeptoren, zu denen die nur in einer geringen Anzahl exprimiert werden. Die höchste Rezeptordichte ließ sich in den Kortexarealen nachweisen. In der Region M wurde mit Werten um die 600 fmol/mg Protein die größte Rezeptordichte ermittelt. Die kleinste Rezeptordichte wurde im GP festgestellt. Hier liegt die mittlere Dichte des Rezeptors bei nur 120 fmol/mg Protein. Die Rezeptordichte der mit BoNT-A injizierten rechten Hemisphäre weist dabei keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten linken Hemisphäre auf.

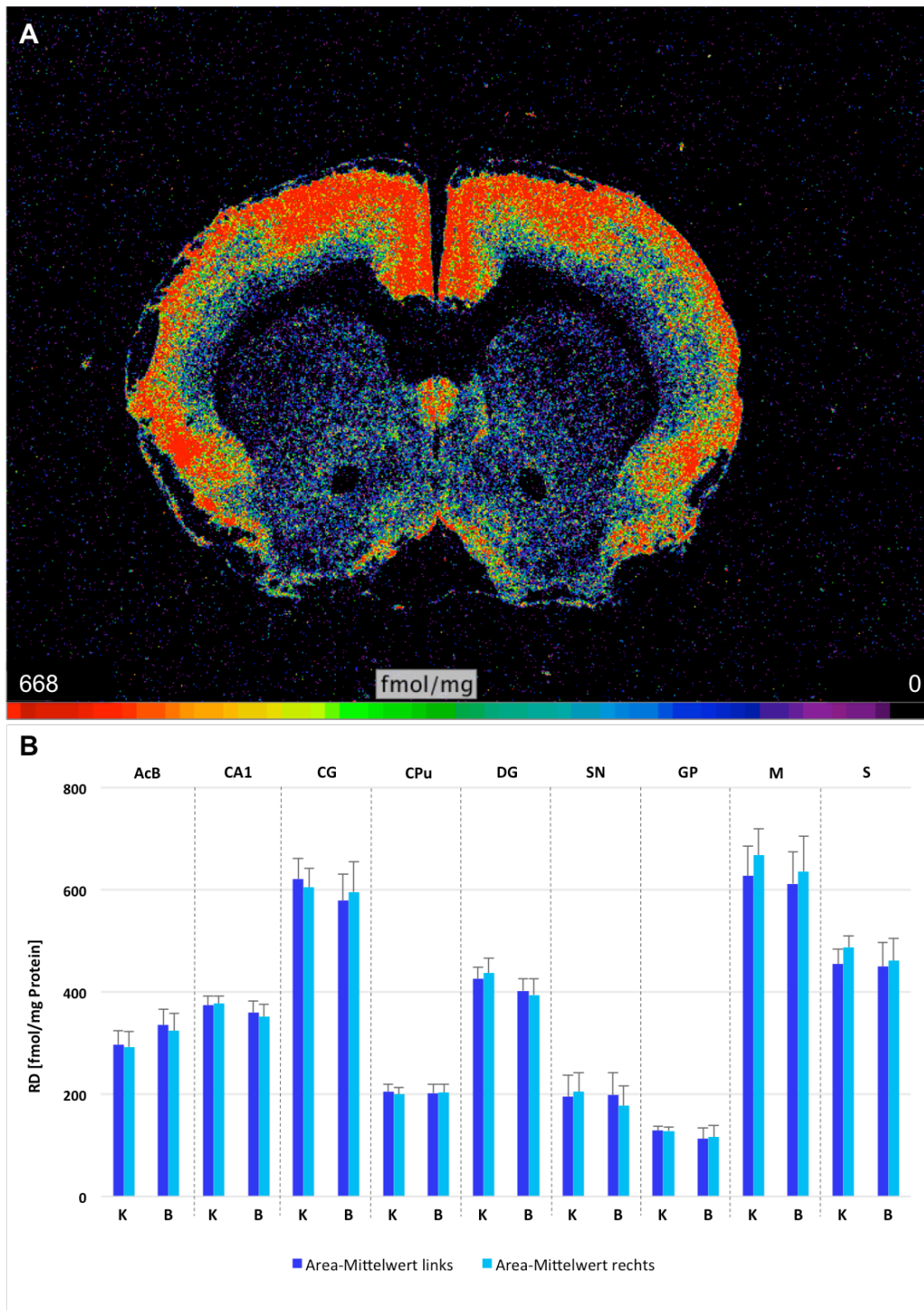


Abbildung 19 Ergebnisse des $\alpha 1$ -Rezeptors **A**) Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. **B**) Graphische Darstellung der Rezeptordichte des. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), SN (=Substantia nigra), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.16 α 2-Rezeptor

Die Abbildung 20 A zeigt eine falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte des α 2-Rezeptors in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene 1. Mit einem Wert von ca. 1150 fmol/mg Protein konnte im AcB die größte Rezeptordichte festgestellt werden.

Die flächengewichteten Dichten für die linke und die rechte Hemisphäre der Gruppe K und B wurden mit Hilfe des Liganden UK14 ermittelt und anschließend graphisch im nachstehenden Säulen-Diagramm (Abbildung 20 B) dargestellt.

Die Ergebnisse der rezeptorautoradiographischen Messung verdeutlichen, dass es für den α 2-Rezeptor keine arealspezifische Verteilung gibt. Die mittleren Rezeptordichten liegen für alle gemessenen Regionen zwischen 400 und 800 fmol/mg Protein. Lediglich im AcB liegt sie mit ca. 1150 fmol/mg Protein über 800 fmol/mg Protein und im GP mit rund 300 fmol/mg Protein unter 400 fmol/mg Protein. Interhemisphärisch wurden keine Signifikanzen festgestellt, weder in der K-noch in der B-Gruppe.

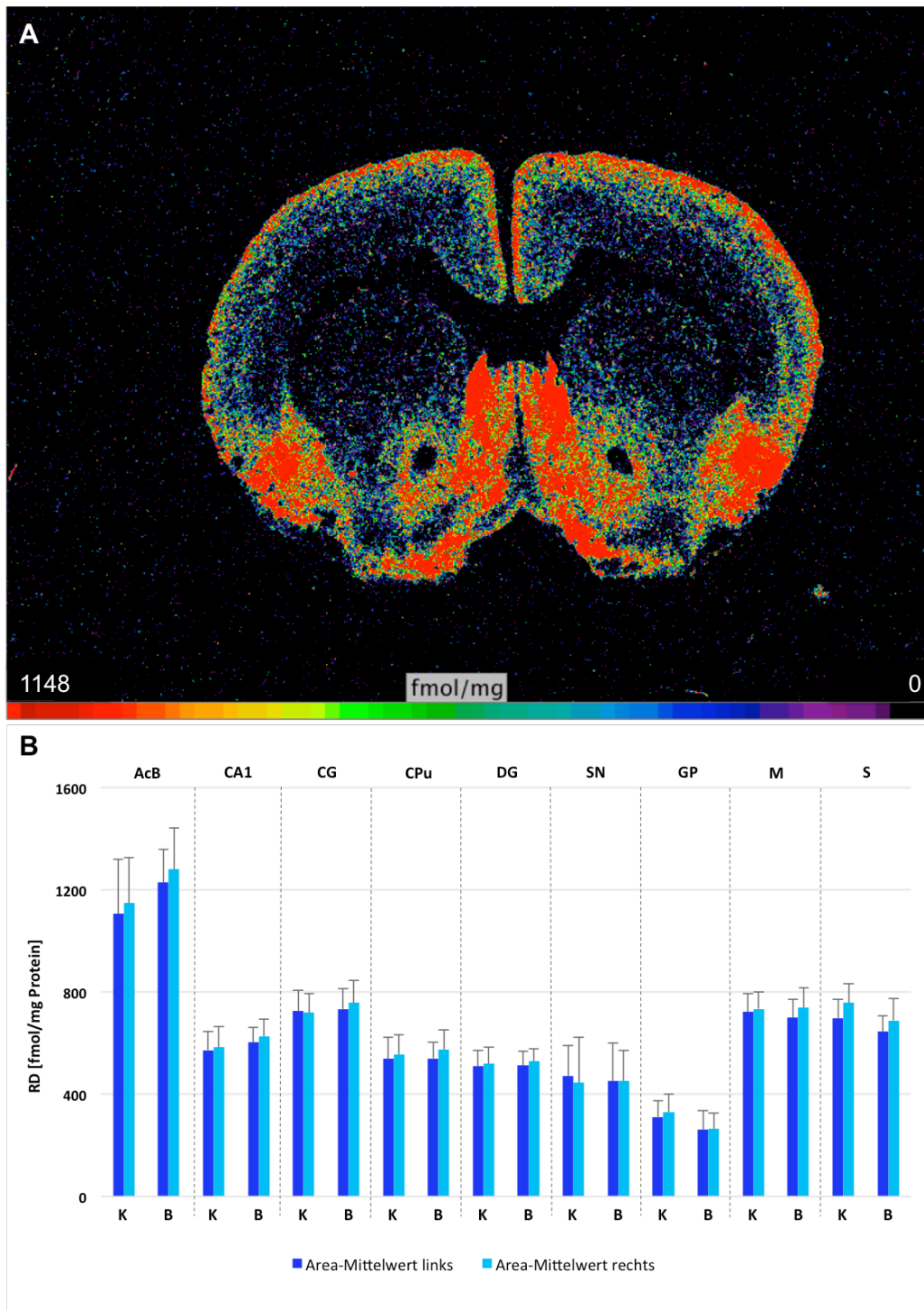


Abbildung 20 Ergebnisse des α_2 -Rezeptors **A**) Falschfarben-kodierte Darstellung der Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnregionen eines Kontrolltieres der Ebene I. **B**) Graphische Darstellung der Rezeptordichte. Dargestellt sind die mittleren Rezeptordichten in den Regionen AcB (=Nucleus accumbens), CA1 (=Cornu ammonis), CG (=cingulärer Kortex), CPu (=Striatum), DG (=Gyrus dentatus), SN (=Substantia nigra), GP (=Globus pallidus), M (=motorischer Kortex), S (=somatosensorischer Kortex) in den beiden experimentellen Gruppen K (Kontrollgruppe) und B (BoNT-A-behandelte native Ratten). In dunkelblau gekennzeichnet sind die kontralateralen/linksseitigen Werte und in hellblau die Werte der rechten, BoNT-A injizierten Hemisphäre. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob und in wie weit sich eine lokale unilaterale intrastriatale BoNT-A-Injektion in den Rattenhirnen auf die Dichte der Rezeptoren klassischer Transmitter auswirkt. Vorherige Studien unserer Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass eine unilaterale BoNT-A Injektion in das Striatum von Hemi-Parkinson-Ratten dem bei MP entstehenden Hypercholinismus entgegenwirken und somit die motorischen Symptome der Erkrankung signifikant verbessern kann (Wree et al., 2011; Holzmann et al., 2012; Antipova et al., 2013; Hawlitschka et al., 2013; Mehlan et al., 2016). In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde ebenfalls mittels quantitativer *in vitro* Rezeptorautoradiographie nachgewiesen, dass es zu Veränderungen dopaminerger-, cholinерger-, und serotonerger Rezeptordichten im Striatum von Hemi-Parkinson-Ratten nach lokaler BoNT-A-Injektion kam. Es konnte bisher gezeigt werden, dass in unbehandelten Hemi-Parkinson-Ratten die mittlere Rezeptordichte des D₂/D₃-Rezeptors deutlich erhöht- und die des nikotinischen ACh-Rezeptors und des serotonergen 5HT_{2a}-Rezeptors deutlich reduziert war (Mann et al., 2018c). Die intrastriatale Injektion des BoNT-A in Hemi-Parkinson-Ratten kompensierte die pathologische Erhöhung des D₂/D₃-Rezeptors und normalisierte somit die Rezeptordichte, welches die signifikante Verbesserung der Motorik der Ratten erklären könnte (Mann et al., 2018a). Ziel der vorliegenden Arbeit war die erstmalige Untersuchung der Wirkung einer lokalen intrastriatalen BoNT-A-Injektion bei unbehandelten Ratten auf die arealspezifischen Dichten unterschiedlicher Rezeptoren in bestimmten Hirnregionen innerhalb und außerhalb der Basalganglienschleife. Die Ergebnisse nach einer BoNT-A-Injektion wurden mit denen unbehandelter Kontrolltiere verglichen, um grundsätzlich einen möglichen Effekt des lokal applizierten Neurotoxins abschätzen zu können. Analysiert wurden dazu die Rezeptorautoradiogramme von unbehandelten Ratten als Kontrolltiere und von BoNT-A-injizierten Ratten. In einer weiteren Fragestellung sollte geklärt werden, ob es nach lokaler unilateraler intrastriataler BoNT-A-Injektion eventuell zu zeitlich gestaffelten Veränderungen post injectionem von Rezeptordichten in den untersuchten Arealen kommt. Bei den hierbei untersuchten 33 Ratten mit unterschiedlichen Überlebenszeiten (zwei Wochen bis neun Monate) post injectionem ergaben sich jedoch für keinen Rezeptor in keinem Hirngebiet nachweisbare zeitabhängige Dichteveränderungen. Aufgrund dessen wurden die Ergebnisse aller BoNT-A injizierten Ratten zusammengefasst.

4.1 Einfluss von BoNT-A auf die Rezeptordichten

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine intrastriatale Applikation von BoNT-A bei gesunden, also bei nicht mit 6-OHDA induzierten Hemi-Parkinson-Ratten, keine signifikanten Auswirkungen auf die Rezeptordichten hat. Bei nativen Ratten finden sich nach intrastriatalem BoNT-A keine Veränderungen der Rezeptordichten; die bei Hemi-Parkinson-Ratten im Striatum erhöht gefundenen D₂/D₃-Rezeptoren werden jedoch durch intrastriatales BoNT-A nahezu normalisiert (Mann et al., 2018a).

4.2 Beurteilung Tiermodell und Übertragbarkeit auf den Menschen

Für alle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde das 6-OHDA-Modell mit unilateraler Injektion in das mediale Vorderhirnbündel der Ratte bzw. das Hemi-Parkinson-Modell der Ratte verwendet. Dieses Modell stellt das am weitesten verbreitete Tiermodell für MP dar. Generell wird bei den MP-Tiermodellen zwischen Toxin-induzierten und genetisch-induzierten Modellen unterschieden. Jedes Modell basiert darauf, einen bis mehrere Aspekte des MP genauer abzubilden. Um ein geeignetes Modell zu wählen, sind je nach Fragestellung unterschiedliche Faktoren wie z.B. das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke, der Grad der Degeneration dopaminergener Neurone, die Bildung von Lewy Bodies und das Absinken der Dopamin-Konzentrationen im Striatum ausschlaggebend. Bei dem hier gewählten Modell wird im Wesentlichen der dopaminerge Zelluntergang und die damit verbundene sinkende Dopamin-Transmitter-Konzentration dargestellt. Die Injektion des 6-OHDA erfolgt in das mediale Vorderhirnbündel und bewirkt eine Apoptose dopaminergener Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra, dessen Axone in das Striatum ziehen. Das 6-OHDA weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu Dopamin auf und ist dadurch fähig über Dopamin-Transporter von den jeweiligen Nervenzellen aufgenommen zu werden. 6-OHDA führt dort über die Förderung von oxidativem Stress und Beeinträchtigung mitochondrialer Funktionen zum Zelltod von bis zu 98% der dopaminergen Neurone (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). Folglich kommt es zum Absinken der Dopamin-Konzentration im ipsilateralen Striatum (Blandini et al., 2008). Dies ist unter anderem ein entscheidender und wichtiger Aspekt für die hohe Bedeutung des 6-OHDA-Modells in der MP-Forschung. Der große Vorteil des lokalen Einsatzes des Toxins 6-OHDA gegenüber der systemischen Gabe von zum Beispiel Reserpin (pharmakologisch-induzierte funktionelle Störungen der dopaminergen Neurotransmission) liegt in seiner Selektivität. Die Verwendung von 6-OHDA führt hier gezielt zur Schädigung der dopaminergen Zellen des nigrostriatalen Systems (Ungerstedt, 1968a). Des Weiteren hat das 6-OHDA-Modell den Vorteil, dass es auch longitudinale Studien ermöglicht und

verschiedene Stadien des MP im Seitenvergleich abbilden kann. Außerdem ermöglicht dieses Modell eine Veränderung von Rezeptordichten bzw. Verfügbarkeiten und deren Transmittersysteme zu untersuchen. Leider kann jedoch nur ein einziges Tiermodell nicht alle Aspekte der Parkinson-Erkrankung, wie dessen Pathologie und Symptomatik vollständig wiedergeben. So ist auch dem 6-OHDA-Modell der Ratte eine Grenze gesetzt. Als Grenze hier zu erwähnen, wäre unter anderem das Fehlen der Lewy-Körperchen und die schnelle Degeneration der Neurone beginnend nach nur 12 Stunden nach 6-OHDA Injektion (Hartung, 2008). Des Weiteren erfordert die Injektion des 6-OHDA einen relativ hohen apparativen und technischen Aufwand, da es die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann und daher stereotaktisch in die interessierende Hirnregion zielgenau eingebracht werden muss. Im 6-OHDA-Modell werden katecholaminerge, das heißt überwiegend nigrostriatale Bahnen beeinflusst und andere neuronale Systeme hingegen nur marginal. Da es im Verlauf der parkinsonschen Erkrankung auch zur Beeinträchtigung kognitiver Leistungen kommt, sollten auch andere neuronale Strukturen wie zum Beispiel der Nucleus basalis (Meynert) berücksichtigt werden. Dieser gehört zu einem der wichtigsten ACh-produzierenden Kernen im ZNS und wird mit dem Fortschreiten der Erkrankung geschädigt (Schulz et al., 2018). Da das 6-OHDA aber das nigrostriatale System beeinträchtigt, wird der Nucleus basalis (Meynert) in diesem Modell nicht berücksichtigt. Andere für MP bedeutsame neuronale Systeme und Strukturen, wie die Area tegmentales ventrales, die rostrale Region, der primär motorische und somatosensorische Kortex, der pedunculo pontinale Kortex sowie nicht dopaminerge Neurone, werden in diesem Modell ebenfalls nicht berücksichtigt. Die begrenzte Betroffenheit des Gehirns kann aber wiederum auch als Vorteil angesehen werden, da das 6-OHDA-Modell durch seine Selektivität und Grenzen eben nur Teilaspekte der Erkrankung abbildet. Dieses Modell bietet so die Möglichkeit, im Seitenvergleich des streng ipsilateralen Systems, Rückschlüsse auf die Ursache genauer treffen und Effekte der nigrostriatalen Degeneration isoliert betrachten zu können.

Aufgrund dessen, dass anhand des Tiermodells die Pathologie des MP im Großen und Ganzen gut abgebildet wird und der Effekt therapeutischer Interventionen auf die motorische und nicht-motorische Symptomatik in Verhaltenstests in vivo und (mit weiterer Methodik) auch in vitro auf molekularer Ebene untersucht werden kann, stellt unser Modell eine gute Option dar, die Mechanismen genauer zu analysieren. Darum stellt sich die Frage, ob dieses Modell auch auf den Menschen übertragbar ist. Obwohl sich Größe und Form des Rattenhirns von dem des Menschen unterscheidet, weisen sie eine ähnliche Physiologie und einen grundsätzlich gleichen Aufbau auf. Insbesondere verfügen sie über ähnliche Hirnregionen, Nervenbahnen

und Neurotransmitter-Systeme (Semple et al., 2013). In Bezug auf die Symptomatik kann betont werden, dass bei den Ratten nach 6-OHDA Läsion insbesondere motorische Einschränkungen der Vorderpfoten zu beobachten sind (Antipova et al., 2013). In unserem Modell erfolgt die Läsion unilateral und auch beim Menschen ist ein unilateraler Beginn des MP zu verzeichnen (Heinrichs-Graham et al., 2017). Trotz mancher Einschränkungen des hier verwendeten Modells lässt sich das 6-OHDA-Modell in einem gewissen Umfang auf den Menschen übertragen. Natürlich gilt es aber immer zu bedenken, dass eine Erkrankung, dessen physiologisches Auftreten in der Tierwelt nicht existiert und deren Ätiopathogenese beim Menschen noch nicht vollständig verstanden und erklärt ist, die Übertragung im Tiermodell gewonnener Daten auf den Patienten nur mit Vorsicht vorzunehmen ist. Des Weiteren werden in diesem Tiermodell Jungtiere eines Geschlechtes (männliche, 3 Monate alte Wistar-Ratten) aus Inzuchtstämmen verwendet, um weitgehend standardisierte Gruppen zu schaffen (Gimsa et al., 2011). Dies hat zwar den Vorteil, dass Fehler minimiert und kleinere Gruppengrößen ermöglicht werden, bietet allerdings auf diesem Weg kein breites Spektrum an genetischer und epigenetischer Varianz wie bei Patienten. Darüber hinaus ist ebenfalls unklar, inwiefern gewonnene Daten aus „jungen“ Rattenhirnen auf MP-Patienten (eher fortgeschrittenen Alters) übertragbar sind. Um eine noch genauere Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die Erkenntnisse im Rattenmodell auch auf den Menschen zu übertragen sind, müssten die Untersuchungen im nächsten Schritt an Primaten durchgeführt werden. Zellbasierte in vitro Verfahren können das komplexe Krankheitsbild mit seiner gestörten Basalganglienverschaltung nicht ausreichend abbilden (Gimsa et al., 2011). Aus diesem Grund würde sich zunächst ein Studiendesign mit nicht-menschlichen Primaten anbieten, um MP noch genauer zu untersuchen. Dies birgt aber ebenfalls ethische Schwierigkeiten bzw. steht in Deutschland nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund stellen Nagetiere, insbesondere Ratten und Mäuse als Säugetiere, eine geeignete Versuchsgruppe dar. Der große Vorteil liegt hier in der Haltung und hohen Reproduktionsrate.

4.3 Lokale BoNT-A-Applikation als Therapieoption

Dass BoNT-A in der Medizin eingesetzt wird und vor allem zu therapeutischen Zwecken angewendet werden kann, ist bereits bekannt. Es wird bisher jedoch hauptsächlich im PNS bzw. in peripheren Strukturen eingesetzt, wohingegen nur wenige Effekte im ZNS beschrieben werden (Hawlotschka et al., 2013). Es wurde bereits nachgewiesen, dass BoNT-A in Axonen transportiert werden kann und dass ein retrograder Transport von peripheren

Strukturen nach zentral (Habermann, 1974; Wiegand et al., 1976), sowie die Passage der Blut-Hirn-Schranke möglich ist (Boroff and Shu Chen, 1975).

Daher ist es umso wichtiger, direkte zentrale Veränderungen, die mit einer BoNT-A Injektion einhergehen können, weiter zu erforschen. Speziell für die Therapie der Parkinson-Erkrankung stehen bisher zur Beeinflussung des striatalen Hypercholinismus nur systemisch verabreichte anticholinerge Medikamente zur Verfügung, die mit zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen verbunden sind. Eine Möglichkeit diese zu umgehen, ist nun BoNT-A lokal ins Striatum zu applizieren. Da periphere BoNT-Injektionen bei MP bereits schon praktiziert werden, galt es in diesem Projekt die Wirkung von intrazerebral-injizierten BoNT-A in einer Reihe von verschiedenen Hirngebieten genauer zu untersuchen. In vitro Studien haben bereits gezeigt, dass BoNT eine starke Wirkung auf zentrale Neurone hat. Dies kann durch eine verlängerte proteolytische Spaltung von SNAP-25 und der Hemmung der Transmitterfreisetzung in zentralen Neuronen erklärt werden (Williamson et al., 1996; Foran et al., 2003). Bisher gibt es nur wenige Arbeiten, bei denen BoNT direkt ins Gehirn von Versuchstieren injiziert wurde (Luvisetto et al., 2003; Antonucci et al., 2008; Gasior et al., 2013). Vergleichbare Untersuchungen, bei denen intrazerebrales BoNT-A im Kontext der Parkinson Forschung in ein Tiermodell injiziert wurde, gibt es erst durch unsere Arbeitsgruppe (Wree et al., 2011). Bisherige Studien der Arbeitsgruppen von Wree et al. (2011) und Antipova et al. (2013) haben bereits gezeigt, dass eine intrastriatale Gabe von BoNT-A im Hemi-Parkinson-Modell der Ratte die auftretenden pathologischen Verhaltensweisen im Hemi-Parkinson-Modell der Ratte über mindestens drei Monate aufheben kann (Wree et al., 2011). Durch verschiedene Verhaltenstests konnte gezeigt werden, dass sich nach BoNT-A-Injektion nicht nur die Motorik der Hemi-Parkinson-Ratten verbesserte, sondern auch die bei MP auftretenden Begleitsymptome wie Depression und Angststörungen durch die intrastriatale Injektion von BoNT-A positiv beeinflusst wurden (Holzmann et al., 2012). Dies zeigte sich bei einer Testung des spontanen Erkundungs- und Angstverhaltens der Hemi-Parkinson-Ratten. Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass sich BoNT-A auch als Therapieoption, nicht nur für die motorischen Symptome, sondern auch für die oft mit MP einhergehenden psychiatrischen Begleitsymptome eignen könnte. Ebenfalls positiv ist, dass um einen signifikanten Therapieeffekt zu verzeichnen, bereits wenige Nanogramm des Neurotoxins ausreichen (Rummel, 2015), um eine lokal begrenzte Wirkung hervorzurufen, welche reversibel ist, aber trotzdem einige Monate (Mehlan et al., 2016) andauert, ohne dabei einen unerwünschten zytotoxischen Effekt hervorzurufen (Sweeney et al., 1989; Shapovalova, 1995; Washbourne et al., 1998; Weinstock et al., 2002; Antipova et

al., 2013; Mehlan et al., 2016; Hawlitschka et al., 2020). Auch ein Jahr nach BoNT-A Injektion wurde von Mehlan et al. keine Veränderung der Anzahl an cholinergen Interneuronen festgestellt, sodass weiterhin die Vermutung besteht, dass BoNT-A keine zytotoxische Wirkung auf diese hat (Mehlan et al., 2016). Wie bereits erwähnt, wurden ergänzend zu den vorherigen Studien bezüglich des Verhaltens der Hemi-Parkinson-Ratten, zur Klärung genauerer Mechanismen, auch auf Rezeptorebene Untersuchungen durchgeführt. Neben der Erkenntnis, dass der therapeutische Effekt von intrastriatalem BoNT-A auf Rezeptorebene vor allem durch den D₂/D₃-Rezeptor vermittelt zu werden scheint (Mann et al., 2018b), zeigte sich, dass der Effekt von BoNT-A auf die Rezeptordichte bei allen Rezeptoren transient war. Das heißt, dass die positive therapeutische Wirkung von BoNT-A auf Hemi-Parkinson-Ratten nicht dauerhaft war und nur vorübergehend anhielt. Dies wurde anhand der unterschiedlichen Überlebenszeiten der Untersuchungsgruppen (zwei Wochen bis neun Monate) festgestellt. Da die unterschiedlichen Überlebenszeiten der von mir untersuchten gesunden, nicht hemiparkinsonoiden Ratten nach BoNT-A-Applikation keinen Einfluss auf die Rezeptordichten aller untersuchten Rezeptoren hatte, wurden die zeitlichen Untergruppen gepoolt. Eine Erklärung für den transienten Effekt des BoNT-A in Hemi-Parkinson-Ratten ist, dass sich nach der BoNT-A Injektion nach einigen Monaten die synaptische Signalübertragung durch die Bildung neuer intakter SNARE-Komplexe wiederherstellt (Ungerstedt, 1968b). Dies bedeutet, dass eine einmalige lokale Gabe von BoNT-A auch nur kurzfristig die Symptome des Hemi-Parkinson lindert. Daher müsste man das Neurotoxin erneut applizieren, damit BoNT-A möglicherweise auch eine langfristige Therapieoption darstellen kann. Dies zeigte sich bereits als möglich: werden Hemi-Parkinson-Ratten in einem 6-monatigen Abstand BoNT-A injiziert, ist der transiente therapeutische Effekt wiederholbar (Hawlitschka et al., 2020). Da der Aufwand für eine lokale intrastriatale Injektion sehr groß ist, wäre auch eine alternative Applikationsform in Erwägung zu ziehen. Eventuell wäre hier über eine lokale Depot-Gabe nachzudenken, sodass eine kontinuierliche Verfügbarkeit des Therapeutikums gewährleistet ist. Dies könnte möglicherweise durch eine additive Aktivierung bzw. Hemmung von Exportproteinen der Blut-Hirn-Schranke, Pumpensysteme vergleichbar mit dem Verfahren der Tiefen-Hirn-Stimulation oder über wirkstoffüberzogene Nanopartikel erreicht werden. Entsprechende Versuche stehen noch aus.

5 Literaturverzeichnis

- Albin RL, Penney JB, Young AB (1989) Speculations on the Functional Anatomy of Basal Ganglia Disorders. *Annu Rev Neurosci* 6:73–94 Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ne.06.030183.000445>.
- Altar C a, Marien MR (1987) Picomolar affinity of 125I-SCH 23982 for D1 receptors in brain demonstrated with digital subtraction autoradiography. *J Neurosci* 7:213–222.
- 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, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M (2008) Long-Distance Retrograde Effects of Botulinum Neurotoxin A. *J Neurosci* 28:3689–3696 Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0375-08.2008>.
- 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 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974608>.
- Arnon SS, Schechter R, TV I, Al E (2001) Botulinum toxin as a biological weapon: Medical and public health management. *JAMA* 285:1059–1070.
- Arroyo-Jimenez MM, Bourgeois JP, Marubio LM, Le Sourd AM, Ottersen OP, Rinvik E, Fairén A, Changeux JP (1999) Ultrastructural localization of the alpha4-subunit of the neuronal acetylcholine nicotinic receptor in the rat substantia nigra. *J Neurosci* 19:6475–6487 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414976>.
- Ascherio A, Schwarzschild MA (2016) The epidemiology of Parkinson’s disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol* 15:1257–1272 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7).
- Baev K V., Greene KA, Marciano FF, Samanta JES, Shetter AG, Smith KA, Stacy MA, Spetzler RF (2002) Physiology and pathophysiology of cortico-basal ganglia-thalamocortical loops: Theoretical and practical aspects. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 26:771–804.
- Blandini F, Armentero MT, Martignoni E (2008) The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Park Relat Disord* 14.
- 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.
- Bloem BR, de Vries NM, Ebersbach G (2015) Nonpharmacological treatments for patients with Parkinson’s disease. *Mov Disord* 30:1504–1520.
- Bonner TI, Buckley NJ, Young a C, Brann MR (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237:527–532.
- Bonner TI, Young a C, Brann MR, Buckley NJ (1988) Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1:403–410 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3272174>.
- Boroff DA, Shu Chen G (1975) On the question of permeability of the blood brain barrier to botulinum toxin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 48:495–504.
- Boyson SJ, McGonigle P, Molinoff PB (1986) Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J Neurosci* 6:3177–3188 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3534157.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200 Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13483658>.
- Cartmell J, Schoepp DD (2000) Regulation of Neurotransmitter Release by Metabotropic Glutamate Receptors. *J Neurochem* 75:889–907 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10936169%5Cnhttp://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.2000.0750889.x.
- Clarke PB, Schwartz RD, Paul SM, Pert CB, Pert a (1985) Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [3H]acetylcholine, [3H]nicotine, and [125I]-alpha-bungarotoxin. *J Neurosci* 5:1307–1315.
- Cui C, Mayer ML (1999) Heteromeric kainate receptors formed by the coassembly of GluR5, GluR6, and GluR7. *J Neurosci* 19:8281–8291.
- Deng P, Zhang Y, Xu ZC (2007) Involvement of Ih in Dopamine Modulation of Tonic Firing in Striatal Cholinergic Interneurons. *J Neurosci* 27:3148–3156 Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5535-06.2007>.
- 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.
- Erbguth FJ (2004) Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Mov Disord* 19.
- Foran PG, Mohammed N, Lisk GO, Nagwaney S, Lawrence GW, Johnson E, Smith L, Roger Aoki K, Dolly OJ (2003) Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E, and F compared with the long lasting type A: Basis for distinct durations of inhibition of exocytosis in central neurons. *J Biol Chem* 278:1363–1371.
- Fritschy J -M, Mohler H (1995) GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: Differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* 359:154–194.
- Fujiyama F, Fritschy JM, Stephenson FA, Bolam JP (1999) Synaptic localization of GABA(A) receptor subunits in the striatum of the rat. *J Comp Neurol* 416:158–172.
- Gasior M, Tang R, Rogawski MA (2013) Long-Lasting Attenuation of Amygdala-Kindled Seizures after Convection-Enhanced Delivery of Botulinum Neurotoxins A and B into the Amygdala in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 346:528–534 Available at: <http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.113.205070>.
- Gerlach M, Reichmann H, Riederer P (2003) *Die Parkinson-Krankheit*. Vienna: Springer Vienna. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-3746-8>.
- Gill DM (1982) Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev* 46:86–94 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373212/>.
- Gimsa U, Nowak K, Mix E, Gimsa J, Strauss U, Sriperumbudur KK, Benecke R (2011) Optimizing a rodent model of parkinson's disease for exploring the effects and mechanisms of deep brain stimulation. *Parkinsons Dis* 2011.
- Goetz T, Arslan A, Wisden W, Wulff P (2007) GABAA receptors: structure and function in the basal ganglia. In, pp 21–41 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612306600034>.
- Habermann E (1974) 125I-labeled neurotoxin from *clostridium botulinum* A: Preparation, binding to synaptosomes and ascent to the spinal cord. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 281:47–56.
- Happe HK, Peters JL, Bergman D a, Murrin LC (1994) Localization of Nicotinic Cholinergic Receptors in Rat Brain: Autoradiographic Studies with [3H]Cytisine. *Neuroscience* 62:929–944.
- Hartung T (2008) Vor- und Nachdenkliches ... zu Tierversuchen. *ALTEX*:10–16 Available at: <http://www.altex.ch/All-issues/Issue.50.html?iid=98&aid=2> [Accessed May 31,

- 2020].
- Hawlitschka A, Antipova V, Schmitt O, Witt M, Benecke R, Mix E, Wree A (2013) Intracerebrally Applied Botulinum Neurotoxin in Experimental Neuroscience. *Curr Pharm Biotechnol* 14:124–130 Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2010&volume=14&issue=1&spage=124> [Accessed May 29, 2020].
- Hawlitschka A, Berg C, Schmitt O, Holzmann C, Wree A, Antipova V (2020) Repeated intrastratial application of botulinum neurotoxin-A did not influence choline acetyltransferase-immunoreactive interneurons in hemiparkinsonian rat brain – A histological, stereological and correlational analysis. *Brain Res* 1742.
- Hedreen JC, Delong MR (1991) Organization of striatopallidal, striatonigral, and nigrostriatal projections in the macaque. *J Comp Neurol* 304:569–595.
- Heinrichs-Graham E, Santamaria PM, Gendelman HE, Wilson TW (2017) The cortical signature of symptom laterality in Parkinson’s disease. *NeuroImage Clin* 14:433–440 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221315821730044X>.
- Holzmann C, Dräger D, Mix E, Hawlitschka A, Antipova V, Benecke R, Wree A (2012) Effects of intrastratial 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 (2006a) 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.
- Horstink M, Tolosa E, Bonuccelli U, Deuschl G, Friedman A, Kanovsky P, Larsen JP, Lees A, Oertel W, Poewe W, Rascol O, Sampaio C (2006b) Review of the therapeutic management of Parkinson’s disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies (EFNS) and the Movement Disorder Society-European Section (MDS-ES). Part II: Late (complicated) Parkinson’s disease. *Eur J Neurol* 13:1186–1202.
- Hunt S, Schmidt J (1978) Some observations on the binding patterns of alpha(symbol)-Bungarotoxin in the central nervous system of the rat. *Brain Res* 157:213–232.
- Jones IW, Bolam JP, Wonnacott S (2001) Presynaptic Localisation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor α 2 Subunit Immunoreactivity in Rat Nigrostriatal Dopaminergic Neurones. *J Comp Neurol* 439:235–247.
- Kaiser S, Wonnacott S (2000) α -Bungarotoxin-Sensitive Nicotinic Receptors Indirectly Modulate [3H]Dopamine Release in Rat Striatal Slices via Glutamate Release. *Mol Pharmacol* 58:312–318 Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org.ep.fjernadgang.kb.dk/content/58/2/312>.
- Korpi ER, Gründer G, Lüddens H (2002) Drug interactions at GABAA receptors. *Prog Neurobiol* 67:113–159.
- Kravitz A V, Tye LD, Kreitzer AC (2012) Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci* 15:816–818 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22544310>.
- Lacey CJ, Boyes J, Gerlach O, Chen L, Magill PJ, Bolam JP (2005) GABAB receptors at glutamatergic synapses in the rat striatum. *Neuroscience* 136:1083–1095.
- Loftis JM, Janowsky A (2003) The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther* 97:55–85.
- Luisetto S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F (2003) Toxicity of botulinum neurotoxins in central nervous system of mice. *Toxicon* 41:475–481 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010102003707>.

- Mann T, Kurth J, Hawlitschka A, Stenzel J, Lindner T, Polei S, Hohn A, Krause B, Wree A (2018a) [18F]fallypride-PET/CT Analysis of the Dopamine D2/D3 Receptor in the Hemiparkinsonian Rat Brain Following Intrastratial Botulinum Neurotoxin A Injection. *Molecules* 23:587 Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/3/587>.
- Mann T, Zilles K, Dikow H, Hellfritsch A, Cremer M, Piel M, Rösch F, Hawlitschka A, Schmitt O, Wree A (2018b) Dopamine, Noradrenaline and Serotonin Receptor Densities in the Striatum of Hemiparkinsonian Rats following Botulinum Neurotoxin-A Injection. *Neuroscience* 374:187–204.
- Mann T, Zilles K, Klawitter F, Cremer M, Hawlitschka A, Palomero-Gallagher N, Schmitt O, Wree A (2018c) Acetylcholine Neurotransmitter Receptor Densities in the Striatum of Hemiparkinsonian Rats Following Botulinum Neurotoxin-A Injection. *Front Neuroanat* 12 Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2018.00065/full>.
- Marshall FH, White J, Main M, Green A, Wise A (1999) GABA(B) receptors function as heterodimers. *Biochem Soc Trans* 27:530–535 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10917635>.
- Mazzocchio R, Caleo M (2015) More than at the neuromuscular synapse: Actions of botulinum neurotoxin A in the central nervous system. *Neuroscientist* 21:44–61.
- McKernan RM, Whiting PJ (1996) Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19:139–143.
- Mehlan J, Brosig H, Schmitt O, Mix E, Wree A, Hawlitschka A (2016) Intrastratial injection of botulinum neurotoxin-A is not cytotoxic in rat brain - A histological and stereological analysis. *Brain Res* 1630:18–24.
- Montal M (2010) Botulinum Neurotoxin: A Marvel of Protein Design. *Annu Rev Biochem* 79:591–617.
- Morrow AL, Battaglia G, Norman AB, Creese I (1985) Identification of subtypes of [3H]prazosin-labelled receptor binding sites in rat brain. *Eur J Pharmacol* 109:285–287 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014299985904327>.
- Müller CE, Scior T (1993) Adenosine receptors and their modulators. *Pharm Acta Helv* 68:77–111 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003168659390012U>.
- Nakano K, Kayahara T, Tsutsumi T, Ushiro H (2000) Neural circuits and functional organization of the striatum. *J Neurol* 247:V1–V15 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/PL00007778>.
- Nambu A, Tokuno H, Hamada I, Kita H, Imanishi M, Akazawa T, Ikeuchi Y, Hasegawa N (2000) Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *J Neurophysiol* 84:289–300 Available at: [papers2://publication/uuid/65AD11E3-97D3-49B5-A631-7DD9FFC7FB27%5Cn%3CGo to ISI%3E://WOS:000088215000027](papers2://publication/uuid/65AD11E3-97D3-49B5-A631-7DD9FFC7FB27%5Cn%3CGo%20to%20ISI%3E://WOS:000088215000027).
- Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal “hyperdirect” pathway. *Neurosci Res* 43:111–117.
- Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knöpfel T (1996) Metabotropic glutamate receptors: A new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* 19:267–271.
- Oertel W, Deuschl G, Poewe W (2011a) Parkinson-Syndrome und andere Bewegungsstörungen.
- Oertel WH, Deuschl G, Poewe W (2011b) Parkinson-Syndrome und andere Bewegungsstörungen.
- Parkinson J (2002) An Essay on the Shaking Palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:223–236 Available at: <http://psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/jnp.14.2.223>.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Peralta EG, Winslow JW, Peterson GL, Smith DH, Ashkenazi A, Ramachandran J, Schimerlik MI, Capon DJ (1987) Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. *Science* 236:600–605 Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3107123>.
- Petralia RS, Wang Y-X, Niedzielski AS, Wenthold RJ (1996) The metabotropic glutamate receptors, MGLUR2 and MGLUR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* 71:949–976 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306452295005331>.
- Pin J-P, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1–26.
- Pradhan AAA, Cumming P, Clarke PBS (2002) [125I]Epibatidine-labelled nicotinic receptors in the extended striatum and cerebral cortex: Lack of association with serotonergic afferents. *Brain Res* 954:227–236.
- Rommelfanger KS, Mitrano DA, Smith Y, Weinshenker D (2009) Light and Electron Microscopic Localization of Alpha-1 Adrenergic Receptor Immunoreactivity in the Rat Striatum and Ventral Midbrain. *Neuroscience* 158:1530–1540.
- Rossetto O, Megighian A, Scorzeto M, Montecucco C (2013) Botulinum neurotoxins. *Toxicon* 67:31–36 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.017>.
- Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C (2014) Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* 12:535–549 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro3295>.
- Rudolph U, Möhler H (2006) GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* 6:18–23.
- Rummel A (2015) The long journey of botulinum neurotoxins into the synapse. *Toxicon* 107:9–24.
- Sato F, Parent M, Levesque M, Parent A (2000) Axonal branching pattern of neurons of the subthalamic nucleus in primates. *J Comp Neurol* 424:142–152.
- Savasta M, Dubois A, Scatton B (1986) Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [3H]SCH 23390. *Brain Res* 375:291–301 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899386907493>.
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 80:717–766.
- Schulz J, Pagano G, Fernández Bonfante JA, Wilson H, Politis M (2018) Nucleus basalis of Meynert degeneration precedes and predicts cognitive impairment in Parkinson's disease. *Brain* 141:1501–1516.
- Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ (2013) Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 106–107:1–16.
- Shapovalova KB (1995) Afferent and efferent mechanisms of the intensification of neostriatal cholinergic activity. *Neurosci Behav Physiol* 25:71–80.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* 17:7503–7522.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353–387.
- Stenmark P, Dupuy J, Imamura A, Kiso M, Stevens RC (2008) Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS Pathog* 4.
- Sweeney JE, Puttfarcken PS, Coyle JT (1989) Galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor: A time course of the effects on performance and neurochemical parameters in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 34:129–137.
- Ungerstedt U (1968a) 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5:107–110 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014299968901647>.

- Ungerstedt U (1968b) 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5:107–110.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485–493 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899370901873>.
- Volpato C, Schiff S, Facchini S, Silvoni S, Cavinato M, Piccione F, Antonini A, Birbaumer N (2016) Dopaminergic Medication Modulates Learning from Feedback and Error-Related Negativity in Parkinson's Disease: A Pilot Study. *Front Behav Neurosci* 10:1–8 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2016.00205/full>.
- Washbourne P, Pellizzari R, Rossetto O, Bortoletto N, Tugnoli V, De Grandis D, Eleopra R, Montecucco C (1998) On the action of botulinum neurotoxins A and E at cholinergic terminals. In: *Journal of Physiology Paris*, pp 135–139. Elsevier Masson SAS.
- Weinstock M, Poltyrev T, Bejar C, Youdim MB (2002) Effect of TV3326, a novel monoamine-oxidase cholinesterase inhibitor, in rat models of anxiety and depression. *Psychopharmacology (Berl)* 160:318–324.
- Whiting PJ (2006) GABA-A receptors: A viable target for novel anxiolytics? *Curr Opin Pharmacol* 6:24–29.
- Wiegand H, Erdmann G, Wellhöner HH (1976) 125I-Labelled botulinum a neurotoxin: Pharmacokinetics in cats after intramuscular injection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 292:161–165.
- Williamson LC, Halpern JL, Montecucco C, Brown JE, Neale EA (1996) Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: Botulinum neurotoxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa. *J Biol Chem* 271:7694–7699.
- Wree A, Mix E, Hawlitschka A, Antipova V, Witt M, Schmitt O, Benecke R (2011) Intra-striatal 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 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2010.09.017>.
- Wree A, Schmitt O (2015) Basal Ganglia. In: *Brain Mapping*, pp 217–227. Elsevier. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123970251002153>.
- Yelnik J, François C, Percheron G, Heyner S (1987) Golgi study of the primate substantia nigra. I. Quantitative morphology and typology of nigral neurons. *J Comp Neurol* 265:455–472.
- Zilles K, Gross G, Schleicher A, Schildgen S, Bauer A, Bahro M, Schwendemann G, Zech K, Kolassa N (1991a) Regional and laminar distributions of alpha 1-adrenoceptors and their subtypes in human and rat hippocampus. *Neuroscience* 40:307–320 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1674110>.
- Zilles K, Palomero-Gallagher N, Schleicher A (2004) Transmitter receptors and functional anatomy of the cerebral cortex. *J Anat* 205:417–432.
- Zilles K, Qü M, Schleicher A (1993) Regional distribution and heterogeneity of alpha-adrenoceptors in the rat and human central nervous system. *J Hirnforsch* 34:123–132 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7901270>.
- Zilles K, Schleicher A, Palomero-Gallagher N, Amunts K (2002) Quantitative Analysis of Cyto- and Receptor Architecture of the Human Brain. In: *Brain Mapping: The Methods*, pp 573–602. Elsevier. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012693019150023X>.
- 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 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1654535>.

6 Thesen

1. MP gehört zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen.
2. Das Hemi-Parkinson-Modell der Ratte stellt ein etabliertes Tiermodell dar, welches sich zur Abbildung der Pathologie und zur Untersuchung symptomatischer Behandlungsverfahren von MP eignet.
3. Mithilfe der in vitro Rezeptorautoradiographie wurden die Dichten zahlreicher Rezeptoren im Rattengehirn nach einseitiger Injektion von 1 Nanogramm Botulinum-Neurotoxin-A in das Striatum bestimmt.
4. Die Dichte von Acetylcholinrezeptoren (M_1 , $M_{2(\text{Antagonist})}$, $M_{2(\text{Agonist})}$, M_3 , nACh) ist nach intrastriatler BoNT-A-Injektion in nativen Ratten in den untersuchten Hirnregionen nicht verändert.
5. Die Dichte von Glutamat-Rezeptoren (KAINAT, NMDA, mGlu_{2/3}) ist nach intrastriatler BoNT-A-Injektion in nativen Ratten in den untersuchten Hirnregionen nicht verändert.
6. Die Dichte des Serotonin-Rezeptors (5HT_{2A}) ist nach intrastriatler BoNT-A-Injektion in nativen Ratten in den untersuchten Hirnregionen nicht verändert.
7. Die Dichte des Dopamin-Rezeptors (D_1) ist nach intrastriatler BoNT-A-Injektion in nativen Ratten in den untersuchten Hirnregionen nicht verändert.
8. Die Dichte von GABA-Rezeptoren (GABA A, GABA A_{mit BZ-BS}, GABA B) ist nach intrastriatler BoNT-A-Injektion in nativen Ratten in den untersuchten Hirnregionen nicht verändert.
9. Die Dichte des Adenosin-Rezeptors (A_1) ist nach intrastriatler BoNT-A-Injektion in nativen Ratten in den untersuchten Hirnregionen nicht verändert.
10. Die Dichte von Adrenozeptoren (α_1 , α_2) ist nach intrastriatler BoNT-A-Injektion in nativen Ratten in den untersuchten Hirnregionen nicht verändert.
11. Die lokale intrastriatale Applikation von BoNT-A in normalen (nicht hemiparkinsonoiden) Ratten führt zu keiner signifikanten Beeinflussung der Dichten der untersuchten Rezeptoren.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser wissenschaftlichen Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Andreas Wree, der mich mit der Thematik vertraut machte und mir dieses interessante Promotionsthema bereitstellte. Darüber hinaus danke ich ihm, dass er mir mit einer einjährigen Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie, die Möglichkeit gab, meinen Horizont bezüglich der universitären Lehre und Forschung zu erweitern.

Ein weiterer Dank gilt dem bedauerlicherweise bereits verstorbenen Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Karl Zilles, der das Forschungsprojekt zusammen mit Herrn Prof. Dr. Wree entwickelt hat und die Durchführung der Rezeptorautoradiographie ermöglichte.

Für die sorgfältige Erstellung und Bereitstellung sämtlicher Materialien und Vorarbeiten, bedanke ich mich bei den Mitwirkenden der Arbeitsgruppe Neuroregeneration des anatomischen Instituts der Universität Rostock sowie bei den Labormitarbeitern des Forschungszentrums Jülich.

Herrn Prof. Dr. med. Oliver Schmitt danke ich für die Strategieentwicklung bezüglich der Messungen und technischen Datenauswertung.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Frau Dr. rer. nat. Teresa Alberts. Sie hat mich während der gesamten Arbeit fachlich sowie emotional stets unterstützt und hat so wesentlich zum Fortschritt meiner Arbeit beigetragen. Sie war nicht nur als (ehemalige) Kollegin eine große Bereicherung, sondern ist auch privat zu einer sehr guten Freundin geworden. Danke Teresa.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, die mir durch ihre uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung das Studium und somit auch die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht hat.

8 Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich, Julia Isabel Findeisen, geboren am 15.11.1991 in Berlin-Steglitz, die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne die unzulässige Hilfe dritter Personen verfasst habe. Dazu habe ich keine anderen, als die in der Arbeit genannten Quellen und Hilfsmittel verwendet. Inhalte und Abbildungen anderer Arbeiten sind als solche kenntlich gemacht. Darüber hinaus versichere ich, 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 04.11.2020

Julia Isabel Findeisen

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Julia Isabel Findeisen
Adresse	Am Vögenteich 25, 18055 Rostock
Geburtsdaten	15.11.1991 in Berlin-Steglitz
Familienstand	ledig, keine Kinder
Nationalität	deutsch
Telefon	0172/ 705 1111
E-mail	julia-isabel@web.de

Berufsausbildung

seit 09/2017	angestellte Zahnärztin im ZMVZ Warnemünde GmbH
01/2017-02/2018	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock, Betreuung der Zahnmedizin-Studenten im Rahmen des anatomischen Präparierkurses im Sommersemester 2017
seit 10/2016	Promotionsarbeit mit dem Thema „Einfluss der intrastriatalen Botulinumneurotoxin-A-Applikation auf die Rezeptordichte im Hemi-Parkinson-Modell der Ratte“ Betreuer und Doktorvater: Prof. Dr. med. Andreas Wree
10/2016	Abschluss des Zahnmedizinstudiums mit dem Staatsexamen, Note: "gut (2)"
03/2014	Zahnärztliche Vorprüfung Note: "gut (2)"
08/2012	Naturwissenschaftliche Vorprüfung Note: "sehr gut (1)"
10/2011	Studium der Zahnmedizin an der Universität Rostock

Aktuelle Fortbildungen

01/2016	praktischer Studentenkurs "Chirurgische Verfahren der Implantation Hands on" am Unterkiefermodell der Firma Straumann
---------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Auslandserfahrung

02/2015 Freiwilligenarbeit in Nepal
"Dental Project in Chitwan, Nepal"

Schulbildung

08/2004 - 07/2011 Humboldt-Gymnasium Potsdam
Abschluss Abitur

08/1998 - 07/2004 Grundschule 56 im Kirchsteigfeld, Potsdam

Zusätzliche Qualifikationen

Sprachkenntnisse: Englisch gut in Wort und Schrift
Spanisch Grundkenntnisse
Französisch Grundkenntnisse

10 Anhang

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Basalganglien und deren Verschaltung.....	7
Abbildung 2 Dorsalsicht auf ein transparentes Rattenhirnmodell	24
Abbildung 3 Bildserie von sieben rezeptorautoradiographischen Bildern.....	27
Abbildung 4 Rezeptorautoradiogramm eines rostralen Frontalschnittes des Rattenhirns	28
Abbildung 5 Ergebnisse des M ₁ -Rezeptors	33
Abbildung 6 Ergebnisse des M ₂ (Antagonist)-Rezeptors.....	35
Abbildung 7 Ergebnisse des M ₂ (Agonist)-Rezeptors	37
Abbildung 8 Ergebnisse des M ₃ -Rezeptors	39
Abbildung 9 Ergebnisse des nACh-Rezeptors.....	41
Abbildung 10 Ergebnisse des Kainat-Rezeptors.....	43
Abbildung 11 Ergebnisse des NMDA-Rezeptors.....	45
Abbildung 12 Ergebnisse des des mGlu _{2,3} -Rezeptors.....	47
Abbildung 13 Ergebnisse des 5HT _{2A} -Rezeptors.....	49
Abbildung 14 Ergebnisse des D ₁ -Rezeptors.....	51
Abbildung 15 Ergebnisse des GABA A-Rezeptors	53
Abbildung 16 Ergebnisse des GABA A-Rezeptors mit Benzodiazepin-Bindungsstelle	55
Abbildung 17 Ergebnisse des GABA B-Rezeptors	57
Abbildung 18 Ergebnisse des A ₁ -Rezeptors.....	59
Abbildung 19 Ergebnisse des α ₁ -Rezeptors.....	61
Abbildung 20 Ergebnisse des α ₂ -Rezeptors.....	63

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der analysierten Rezeptoren	14
Tabelle 2 Übersicht der Rezeptoren mit den jeweils gemessenen Hirnregionen	28
Tabelle 3 Angaben zur verwendeten ligandenspezifischen Standardaktivität (SA), Dissoziationskonstante (Kd) und Realkonzentration (L) der tritiummarkierten Liganden.....	30