

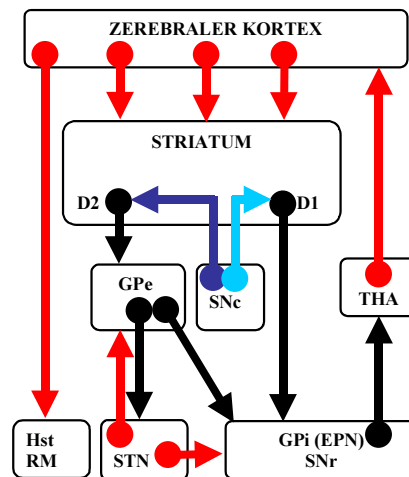
## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Die Basalganglien

Die Basalganglien sind eine Gruppe untereinander verschalteter, subkortikal gelegener Kerne des Vertebratengehirns (s. Abb. 1), die motorische, okulomotorische, assoziative sowie auch limbische Informationen erhalten, verarbeiten und unter Zwischenschaltung des Thalamus (THA) schleifenartig zu frontalen Kortexarealen zurückleiten (Alexander et al., 1990). Heute ist unumstritten, daß die Basalganglien maßgeblich an der Pathophysiologie neurologischer Erkrankungen, die mit einer gestörten Motorik einhergehen, beteiligt sind. Hierbei ist ihre Funktion in der Kontrolle der Motorik als weitaus empfindlicher und komplexer anzusehen als ein nur direkter Einfluß auf die Muskelkontraktionen (Smith et al., 1998).

Beim Säugetier zählen zu diesen Strukturen das dorsale Striatum, der Nucleus accumbens, das Tuberculum olfactorium, der Globus pallidus (GP), der subthalamische Nucleus (STN) sowie die Substantia nigra (SN) (Smeets et al., 2000). Das sog. dorsale Striatum des Nagers (nachfolgend als Striatum bezeichnet) läßt sich bei den Primaten in den Nucleus caudatus und das Putamen unterteilen und gilt als Eingangsstruktur der Basalganglien. Der interne Anteil des GP (GPi) des Primaten entspricht dem entopeduncularen Nucleus (EPN) des Nagers und bildet zusammen mit den dopaminarmen Anteilen der SN, der SN pars reticulata (SNr), die Basalganglienausgangsstruktur. Der externe Anteil des GP (GPe) der Primaten entspricht dem gesamten GP des Nagers (Smith et al., 1998). Wie in Abb. 1 dargestellt, erhält das Striatum hauptsächlich exzitatorische glutamaterge und aspartaterge Zuströme vom zerebralen Kortex sowie dopaminerge Zuströme von der SN pars compacta (SNc). Desweiteren erhält es glutamaterge Projektionen vom THA und der Amygdala, sowie serotonerge Projektionen von den Raphekernen und dem Locus coeruleus (Pollack, 2001). Die erhaltenen Signale werden im Striatum durch sog. Interneurone (s. 2.2.2.) verschaltet. Durch hemmende GABAerge Projektionsneurone (s. 2.2.1.) werden sie anschließend entweder *indirekt* polysynaptisch über den GPe und den STN oder *direkt* monosynaptisch zum GPi und der SNr geleitet (Herrero et al., 2002). Von dort aus werden die Informationen über GABAerge Bahnen zum THA und anschließend über glutamaterge Bahnen zurück zur Hirnrinde geleitet.

Abb. 1



**Abb. 1:** Vereinfachte schematische Darstellung wichtiger Verbindungen innerhalb der Basalganglien unter physiologischen Bedingungen. Exzitatorische **glutamaterge bzw. aspartaterge Verbindungen** sind durch **rote**, **dopaminerge** durch **blaue** und **inhibitorische GABAerge** durch **schwarze Pfeile** gekennzeichnet. Dargestellt ist die sog. kortiko-striato-thalamo-kortikale Feedbackschleife. Das Striatum erhält vom Kortex glutamaterge Zuströme, die über GABAerge Projektionsneurone entweder *direkt* oder aber *indirekt* über den GPe und den STN zum Ausgangskomplex der Basalganglien (GPi bzw EPN und SNr) geleitet werden. Die Verschaltung vom GPe zum STN ist ebenfalls GABAerg, vom STN zum Ausgangskomplex hingegen glutamaterg. Dort projizieren GABAerge Neurone zum ventralen THA, der wiederum durch glutamaterge Neurone exzitatorisch auf den Kortex einwirkt. Eine Modulation dieser Feedbackschleife kann durch dopaminerge Neurone der SNc erfolgen, die entweder durch die Aktivierung von D<sub>1</sub>-Rezeptoren fördernd auf den direkten oder über die D<sub>2</sub>-Rezeptoren hemmend auf den indirekten Weg wirken (GPe: Globus pallidus externus, GPi: Globus pallidus internus, EPN: Nucleus entopeduncularis, SNc: Substantia nigra pars compacta, SNr: Substantia nigra pars reticulata, STN: subthalamischer Nucleus, THA: Thalamus, Hst: Hirnstamm, RM: Rückenmark). Nach Vitek und Giroux, 2000.

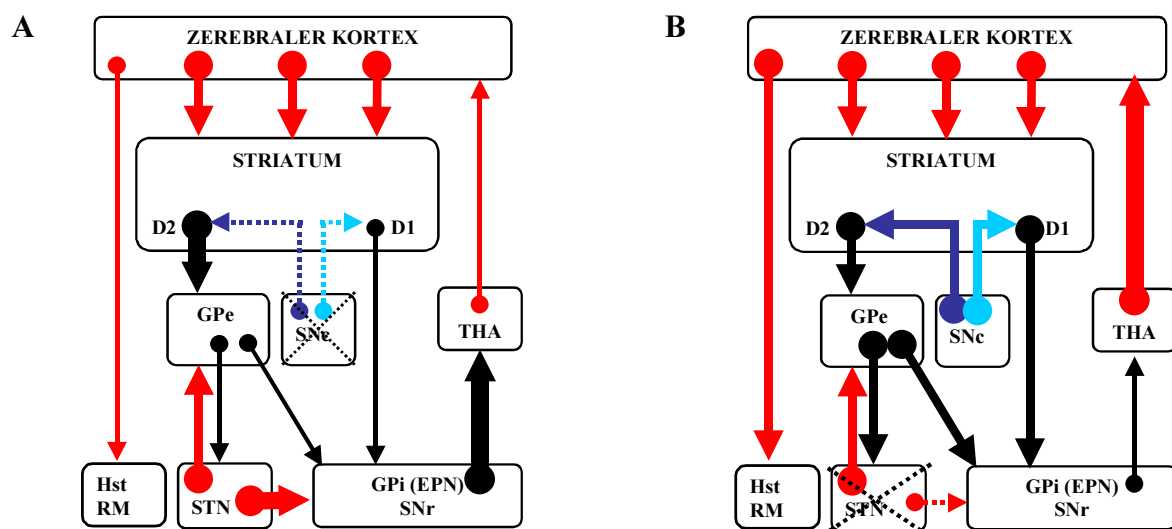
Zudem haben die dopaminergen Neurone der SNc sowohl auf die direkten und als auch den indirekten Weg einen regulatorischen Einfluß. Über die Dopamin<sub>1</sub>(D<sub>1</sub>)-Rezeptoren aktiviert Dopamin die Neurone des direkten Weges und über die Dopamin<sub>2</sub>(D<sub>2</sub>)-Rezeptoren hemmt es die Projektionsneurone des indirekten Weges (Nakano et al., 2000; Vitek und Giroux, 2000).

Eine Hypothese zur Erklärung der Basalganglienfunktion postuliert, daß der *direkte* Weg kortikal initiierte Bewegungen durch eine Disinhibition des THA verstärkt, während die polysynaptische *indirekte* Verschaltung antagonistische oder ungewollte Bewegungen inhibiert (Vitek, 2002). Es wird davon ausgegangen, daß unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen den beiden beschriebenen Projektionsbahnen existiert. Basierend auf diesem Erklärungsansatz müßten Störungen innerhalb des Gleichgewichtes zu

fehlerhaften Bewegungsabläufen führen, die je nach Lokalisation und betroffenem Neurotransmittersystem in einer hypo- oder einer hyperkinetischen Bewegungsstörung resultieren (Vitek, 2002).

Tatsächlich konnten sowohl klinische Studien als auch Untersuchungen in Tiermodellen diese Annahme bestätigen (Vitek, 2002). Hypokinesien wie z.B. die Parkinson'sche Krankheit sind gekennzeichnet durch Akinesie oder Bradykinesie, Muskelrigidität, gestörte Bewegungsinitiation sowie teils auch durch einen Ruhetremor (Lovinger und Tyler, 1996; Rouse et al., 2000). Die Degeneration dopaminerger Neurone in der SNc und somit ein Mangel an Dopamin im Striatum führt über den indirekten und den direkten Weg zu einer erhöhten Aktivität der Basalganglienausgangsstruktur (GPi), was eine Überinhibition thalamokortikaler Neurone zur Folge hat (s. Abb. 2A) (Ramsden et al., 2001; Rouse et al., 2000).

Abb. 2



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Hypothese zur Entstehung hypokinetischer (A) und hyperkinetischer (B) Bewegungsstörungen. Bei der Parkinson'schen Krankheit (A) führt ein Verlust dopaminerger Neurone der SNc sowohl über den direkten als auch über den indirekten Weg der Basalganglienschleife zu einer mangelnden Inhibition des Ausgangskomplexes (GPi/SNr). Daraus resultiert eine vermehrte Hemmung thalamischer Kerne mit der Folge einer verminderten Aktivität thalamokortikaler Neurone. Der Hemiballismus (B) kann durch eine Läsion des STN verursacht werden. Die mangelnde Erregung des Basalganglienausgangskomplexes führt zu einer Disinhibition thalamischer Kerne. Als Folge tritt eine verstärkte Aktivität thalamokortikaler Neurone ein. Die Stärke der Pfeile gibt das Ausmaß der neuronalen Aktivität wieder (vgl. Abb. 1). Nach Vitek und Giroux, 2000. Weitere Erläuterungen s. Abb. 1.

Hyperkinetische Erkrankungen wie Chorea Huntington und der Hemiballismus sind durch unkontrollierte und relativ schnelle Bewegungen gekennzeichnet, die jeweils mit pathophysiologischen Veränderungen der Basalganglien assoziiert sind (Lovinger und Tyler, 1996; Vitek und Giroux, 2000). So kann der Hemiballismus die Folge eines Schlaganfalls sein, wenn durch diesen der STN stark beschädigt wurde. Die Patienten leiden dann unter unkontrollierten Bewegungen der Extremitäten der kontralateralen Seite der Läsion (Lovinger und Tyler, 1996). Wie Abb. 2B zeigt, werden diese Symptome auf eine erhöhte pallidale Hemmung des STN zurückgeführt, die über eine verminderte inhibitorische Aktivität der Basalganglienausgangsstruktur zu einer Enthemmung des THA führt (Vitek, 2002).

Die im Kapitel 2.2. detaillierter behandelten Dystonien wurden lange aufgrund ihrer Symptomatik den hyperkinetischen Bewegungsstörungen zugeordnet. Gerade elektrophysiologische Untersuchungen an Dystoniepatienten konnten jedoch zeigen, daß diese Kategorisierung den pathophysiologischen Veränderungen, die mit dieser Erkrankung einhergehen, nicht gerecht wird (Vitek, 2002). Trotz einer nachgewiesenen reduzierten Entladungssrate des GPi bei Dystoniepatienten führen Pallidotomien zu einer Verbesserung der Symptomatik, ein Hinweis darauf, daß das Entladungsmuster ebenfalls entscheidend an der Pathogenese dieser Bewegungsstörung beteiligt ist.

Dem Striatum kommt als Eingangsstruktur der Basalganglien in der Pathophysiologie von neurologischen Bewegungsstörungen eine besondere Rolle zu (Lovinger und Tyler, 1996). Da es glutamaterge Zuströme aus der Hirnrinde entgegennimmt und über den direkten und indirekten Weg zum GPi und der SNr weiterleitet, können pathologische Veränderungen innerhalb des Striatums alle nachfolgenden Strukturen beeinflussen und zu den oben genannten Störungen beitragen (Lovinger und Tyler, 1996).

## **2.2. Nervenzellen des Striatums**

Wie unter 2.1. beschrieben, erhält das Striatum (= dorsales Striatum oder Caudate-Putamen) zahlreiche Informationen aus verschiedenen Hirnregionen. Der weiteren Verarbeitung der Informationen innerhalb des Striatums kommt große Bedeutung zu, was durch Bewegungsstörungen bei pathomorphologischen Veränderungen im Striatum widerspiegelt wird (Lovinger und Tyler, 1996). Welche Zelltypen bei der Pathogenese eine besondere Bedeutung einnehmen, ist jedoch bislang nicht eingehend untersucht worden.

Die Neurone des Striatums lassen sich im wesentlichen in 2 unterschiedliche Neuronentypen einteilen: die Projektionsneurone, deren Dendriten mit sog. „spines“ besetzt sind und die Interneurone, die aufgrund nicht vorhandener „spines“ auch zu den „aspiny neurons“ zählen (Nakano et al., 2000). Das Verhältnis der striatalen Projektionsneurone zu den Interneuronen beträgt bei der Ratte 9:1, beim Primaten hingegen nur 3:1 (Graveland und DiFiglia, 1985).

### **2.2.1. Striatale Projektionsneurone**

Die striatalen Projektionsneurone, welche etwa 90-95% der striatalen Neurone des Nagers darstellen, besitzen einen Zellkörper mit einem Durchmesser von etwa 12-20  $\mu\text{m}$ , von dem 4-5 Dendriten ausgehen, die mit dornartigen Fortsätzen („spines“) ausgestattet sind (Nakano et al., 2000; Pollack, 2001). Diese Fortsätze dienen als Ansatzpunkt für kortikostriatale glutamaterge Bahnen, welche asymmetrische Synapsen in Nähe der Köpfe der „spines“ formen, sowie für dopaminerge Bahnen der SNc, die symmetrische Synapsen in der Halsregion der „spines“ bilden (Nakano et al., 2000).

Die Projektionsneurone des Striatums sind GABAerg (s. Abb. 1). Sie lassen sich gemäß ihres Neuropeptidgehaltes, ihrer Rezeptorausstattung und ihres Zieles unterscheiden in: (1) Enkephalin-haltige und D<sub>2</sub>-Rezeptor-exprimierende Neurone, die zum GPe (striato-pallidale Neurone; indirekter Weg) projizieren und (2) Substanz P- und Dynorphin-haltige Neurone, die bevorzugt den D<sub>1</sub>-Rezeptor exprimieren und deren Zielstrukturen die SNr bzw. der GPi (striato-nigrale Neurone; direkter Weg) sind. Zusätzlich enthalten beide Neuronentypen Neurensin (Nakano et al., 2000). Weitere Studien konnten auf den striatalen Projektionsneuronen sowohl ionotrope (Bernard et al., 1997; Kuppenbender et al., 2000; Smith et al., 2001) als auch metabotrope Glutamatrezeptoren (Rouse et al., 2000; Smith et al., 2001) nachweisen, auf deren Vorkommen und Zusammensetzung im Kapitel 2.4. detaillierter eingegangen wird.

Die Aufgabe dieser striatalen Projektionsneurone besteht darin, Informationen vom Kortex, THA und der SNc entgegenzunehmen und über den direkten und indirekten Weg zu den Basalganglienausgangsstrukturen zu leiten (Pollack, 2001). Das Gleichgewicht in der Aktivitätsrate und dem -muster zwischen diesen beiden Bahnen ist für die Kontrolle der Motorik wichtig (Vitek, 2002).

### 2.2.2. Striatale Interneurone

Die striatalen Interneurone stellen insgesamt 5-10% der striatalen Neurone und besitzen, wie oben erwähnt, im Gegensatz zu den Projektionsneuronen keine „spines“, sie sind also „aspiny“, d.h. dornelos (Marin et al., 2000). Ihnen kommt eine entscheidende Rolle bei der Vernetzung und Modulation der von anderen Hirnregionen eingehenden Signale zu. Aufgrund ihrer Ausstattung können sie in vier Gruppen unterteilt werden: (1) cholinerge, (2) GABAerge PV<sup>+</sup>, (3) GABAerge Calretinin-reaktive Interneurone und (4) Somatostatin-haltige Interneurone, welche auch NOS, Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-diaphorase (NADPH-d), Neuropeptid Y sowie GABA (bzw. Glutamatdecarboxylase [GAD<sub>67</sub>]) enthalten (Kawaguchi et al., 1995).

Die Acetylcholin-haltigen Interneurone werden aufgrund der Größe ihres fusiformen Zellkörpers (20–50 µm) auch „large aspiny neurons“ genannt (Nakano et al., 2000). Sie vertreten 1–2% der Gesamtpopulation striataler Neurone (Kawaguchi, 1997; Pollack, 2001). Sie empfangen glutamaterge Afferenzen vom Kortex und THA, Zuströme von den striatalen Projektionsneuronen (GABA/Substanz P) und dopaminerge Eingänge von der SNc (Morello et al., 1997; Pollack, 2001). Sie innervieren striatale Projektionsneurone sowie PV<sup>+</sup>- und NOS<sup>+</sup>-Interneurone (Kawaguchi, 1997; Kawaguchi et al., 1995; Morello et al., 1997; Pollack, 2001). Den cholinergen Interneuronen kommt somit eine bedeutende modulatorische Rolle bei der Kontrolle motorischer Funktionen zu (Buchholzer und Klein, 2002). Dieser Interneuronentyp kann immunhistochemisch durch die Cholinacetyltransferase zuverlässig markiert und nachgewiesen werden (Kawaguchi et al., 1995).

Die GABAergen PV<sup>+</sup>-Interneurone repräsentieren 3-5% der striatalen Neuronenpopulation. Sie exprimieren das Ca<sup>2+</sup>-bindende Protein Parvalbumin, und ihre Zellkörper sind mit einem Durchmesser von 10-25 µm etwas größer als die striatalen Projektionsneurone (Kawaguchi et al., 1995; Nakano et al., 2000). Ihre Dendriten erhalten glutamaterge (vom Kortex und THA), GABAerge (von den striatalen Projektionsneuronen), cholinerge (von Interneuronen) und dopaminerge Afferenzen (von der SNc) (Morello et al., 1997; Pollack, 2001). PV<sup>+</sup>-Interneurone innervieren striatale GABAerge Projektionsneurone sowie NOS<sup>+</sup>-Interneurone (Kawaguchi et al., 1995; Morello et al., 1997). Sie sind hauptverantwortlich für den negativen Rückkopplungsmechanismus kortikostriataler glutamaterger Bahnen und tragen durch die Hemmung GABAerger Projektionsneurone maßgeblich zum Gleichgewicht des direkten und indirekten Weges der Basalganglienschleife bei (Kawaguchi et al., 1995; Morello et al., 1997; Nakano et al., 2000). So kann ein Wegfall der Hemmung durch PV<sup>+</sup>-Interneurone wiederum

in eine übermäßige Erregung des Kortex durch den THA resultieren. Bei der *dt<sup>sc</sup>*-Hamstermutante konnte eine signifikante Reduktion dieses Interneuronentyps nachgewiesen werden, worauf in Kapitel 2.4.3.2. näher eingegangen wird (Gernert et al., 2000).

Das Ca<sup>2+</sup>-bindende Protein Calretinin wird von einer Population kleinerer Interneurone (7-20 µm) exprimiert (Kawaguchi et al., 1995). Über die Physiologie und Bedeutung dieses Interneuronentypes ist wenig bekannt, und es gibt keine offensichtliche Korrelation zwischen der Reaktivität für Calretinin und Eigenschaften der Nervenzellen (Schlosser et al., 1999).

#### 2.2.2.1. Stickoxidsynthetase-immunreaktive (NOS<sup>+</sup>) Interneurone

Die vierte Gruppe striataler Interneurone, die NOS<sup>+</sup>-Interneurone, repräsentiert 1-2% der gesamten striatalen Neurone (Kawaguchi et al., 1995). Von den etwa 12-25 µm großen Zellkörpern gehen jeweils 3 oder 4 relativ lange und gerade verlaufende Dendriten ab (Kawaguchi et al., 1995; Nakano et al., 2000). Sie erhalten glutamaterge Afferenzen aus dem Kortex, dopaminerge Zuströme aus der SNc und sind sowohl Ziel GABAerger PV<sup>+</sup>- als auch cholinergischer Interneurone (Kawaguchi, 1997; Kawaguchi et al., 1995; Morello et al., 1997; West und Galloway, 1997a). Die Axone der NOS<sup>+</sup>-Interneurone sind nicht myelinisiert, besitzen mit einer Länge von bis zu 1 mm eine erhebliche Reichweite und bilden mit ihren Fortsätzen symmetrische Synapsen (Morello et al., 1997; Nakano et al., 2000).

Den NMDA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran NOS<sup>+</sup>-Interneurone kommt vermutlich eine entscheidende funktionelle Bedeutung zu. Werden diese Interneurone angeregt, so erfolgt über einen Calcium-/Calmodulin gekoppelten Prozeß eine Aktivierung der NOS. Dieses Enzym setzt aus Arginin NO frei, welches durch die Zellmembran in den synaptischen Spalt diffundiert (Bogdanov und Wurtman, 1997). Da NO keinen spezifischen Rezeptor benötigt und einfach durch Zellmembranen umliegender Zellen diffundieren kann, sind *alle* Zellen in näherer Umgebung potentielle Ziele modulatorischer Einflüsse (Morello et al., 1997). Die unterschiedlichen Wirkungen von NO werden hauptsächlich durch die Aktivierung der Guanylatcyclase vermittelt. Dieses heterodimäre Enzym katalysiert die Umsetzung von Guanosintriphosphat zum zyklischen Guanosinmonophosphat, einem „second messenger“, über welchen Proteinkinasen aktiviert und eine Vielzahl weiterer Antworten ausgelöst werden (Ballou et al., 2002). Das von striatalen NOS<sup>+</sup>-Interneuronen freigesetzte NO als Antwort auf kortikale oder pallidale Erregungen reguliert auch den lokalen Blutfluß (Centonze et al., 2001).

Obwohl bis heute nur eine unvollständige Charakterisierung des Einflusses von NO auf die striatale neuronale Aktivität erfolgt ist, deuten zahlreiche Hinweise auf eine Involvierung von NO in die Regulation und Vermittlung der striatalen Neurotransmission hin (West and Grace, 2000). Vermutlich erhöht NO in Form eines positiven Feedback-Mechanismus die striatale Glutamatfreisetzung (Bogdanov und Wurtman, 1997; Danysz et al., 1995; West und Galloway, 1997b). Desweiteren soll es die Dopaminfreisetzung steigern (West und Galloway, 1997b) und den Rücktransport von Monoaminen in die synaptischen Endigungen reduzieren (Kiss und Vizi, 2001). Die striatale Acetylcholinfreisetzung scheint ebenfalls durch NO stimuliert zu werden (Buchholzer und Klein, 2002).

Neben dem direkten Einfluß auf die Transmitterfreisetzung wird NO ebenfalls eine entscheidende Bedeutung in der Ausbildung synaptischer Plastizität zugesprochen (West und Grace, 2000). Die sog. Langzeitdepression (LTD) und Langzeitpotenzierung (LTP) sind Formen neuronaler Gedächtnisbildung und werden durch spezifische neuronale Aktivitätsmuster provoziert (Centonze et al., 2003). Sie resultieren in langanhaltenden Veränderungen der Effektivität synaptischer Transmission und bilden hierdurch die Basis für Lern- und Gedächtnisprozesse (Abbott und Nelson, 2000; Centonze et al., 2003). In Studien konnte nachgewiesen werden, daß eine verstärkte striatale NO-Freisetzung durch die wiederholte Aktivierung kortikostriataler Afferenzen zur Ausbildung einer LTD an postsynaptischen Membranen striataler Projektionsneurone führt. Diese konnte durch NOS-Inhibitoren erfolgreich verhindert werden (Centonze et al., 2003).

Durch die eindeutige Differenzierung verschiedener Interneuronentypen mittels immunhistochemischer Markierung sind heute Untersuchungen zu ihrer physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung möglich. Die Markierung striataler NOS<sup>+</sup>-und NADPH-exprimierender Interneurone kann durch die Anwendung von Antikörpern (Ak) gegen die NOS erfolgen, worauf in Kapitel 2.6.3. näher eingegangen wird.

Aufgrund ihrer vielschichtigen Interaktionen mit zahlreichen Neuronen und Neurotransmittersystemen des Striatums und der Beteiligung an der Ausbildung synaptischer Plastizität ist eine Involvierung der NOS<sup>+</sup>-Interneurone in die Pathophysiologie von Basalglienerkrankungen denkbar. Hinweise hierauf liefern sowohl eine nachgewiesene reduzierte Expression striataler NOS in einem Tiermodell für Chorea Huntington als auch eine erhöhte Produktion von NO bei der Parkinson'schen Krankheit (Deckel et al., 2002).



## **2.3. Dystonien**

### **2.3.1. Definition**

Die Dystonie ist definiert als ein „neurologisches Syndrom“, in dem „anhaltende Muskelkontraktionen drehende, sich wiederholende Bewegungen oder abnorme Haltungen verursachen“ (Fahn, 1988).

Erste Beschreibungen von Dystonie-Patienten existieren bereits aus dem 19. Jahrhundert, der heute verwendete Begriff „Dystonie“ wurde jedoch erst 1911 von Oppenheim eingeführt. Mit dieser Bezeichnung verlieh er seiner Überzeugung Ausdruck, daß diese Bewegungsstörung die Folge eines veränderten Muskeltonus darstelle (Goetz et al., 2001). Erst in den 1980er und 1990er Jahren gelang eine systematische Erschließung dieses Krankheitsbildes mit Festlegung einer Definition (s.o.) und Einteilung verschiedener Formen dystoner Bewegungsstörungen im Jahre 1984 durch das AD HOC COMMITÉE der „Dystonia Medical Research Foundation“.

Bis auf die in der Forschung verwendeten Nagermutanten (s. 2.4.) sind in der Literatur keine Dystonien bei unseren Haustieren beschrieben. In Hinsicht auf die in der Humanmedizin häufig auch heute noch problematische Diagnosestellung ist jedoch davon auszugehen, daß dies nicht durch eine mangelnde Existenz sondern vielmehr durch eine fehlende Erkennung begründet ist. So wurden von Clemmons und Mitarbeiter (1980) neurologisch bedingte Bewegungsstörungen bei Scotch Terriern beschrieben, die Parallelen zu der primären paroxysmalen Dyskinesie erkennen lassen.

Die große Heterogenität in der Symptomatik der verschiedenen Dystonieformen führte in den vergangenen Jahren zu erheblichen Problemen in der Diagnosestellung. So wurde in Familienstudien nachgewiesen, daß idiopathische Dystonieformen mit einer Rate von 25% (fokale Dystonie) oder mehr (generalisierte Dystonie) fehldiagnostiziert wurden (Warner, 2000). Heute ist bekannt, daß die Dystonien in ihrer Gesamtheit häufiger auftreten als die Muskeldystrophien oder Chorea Huntington. Schätzungen gehen sogar davon aus, daß sie eine vergleichbare Prävalenz wie die Multiple Sklerose besitzt (Marsden und Fahn, 1998; Warner, 2000). Etwa 2/3 der Dystonien sind idiopathisch (Kramer et al., 1995).

### 2.3.2. Klassifizierung und Genetik der Dystonien

Die Dystonie kann den **Dyskinesien**, im ursprünglichen Sinne des Wortes „gestörte Bewegungen“, zugeordnet werden, heute ist dieser Begriff jedoch häufig den medikamentös induzierten Bewegungsstörungen vorbehalten.

Als Leitsymptom der Dystonie gelten unwillkürliche Kokontraktionen von Flexoren und Extensoren bei ungetrübtem Bewußtsein mit unbeeinflußten intellektuellen Fähigkeiten (Marsden, 1988; Mink, 2003). Dystone Bewegungen unterscheiden sich in Hinblick auf die Geschwindigkeit, Stärke und Frequenz der Verdrehungen und weisen somit eine starke Heterogenität im klinischen Erscheinungsbild auf.

Daher kann eine Klassifizierung der Dystonie nach unterschiedlichen Aspekten erfolgen, so z.B. nach der Ätiologie, der Topographie, dem Eintrittsalter und der Dauer der Attacken.

Aus ätiologischer Sicht kann man die primäre (idiopathische) von der **sekundären** (symptomatischen) Dystonie unterscheiden. Symptomatische Dystonien sind oft assoziiert mit pathomorphologischen Veränderungen innerhalb der Basalganglien, insbesondere des Striatums, und können als Folge von metabolischen Störungen, Schlaganfällen, Sauerstoffunterversorgung, Traumata oder medikamentösen Behandlungen auftreten (Vitek, 2002). Gerade die letzte Ursache stellt ein bedeutendes therapeutisches Problem dar, denn das zur Behandlung von Parkinson-Patienten eingesetzte Levodopa (L-Dopa) kann zur Ausbildung von Dystonien führen (Ikeda et al., 1999; Luginer et al., 2000).

Bei **primären** Dystonien sind hingegen keine pathomorphologischen Veränderungen innerhalb der Basalganglien durch Standardtechniken nachweisbar. Aufgrund der Befunde bei symptomatischen Formen werden allerdings biochemische Dysfunktionen in diesem Bereich als Ursache vermutet (Richter und Löscher, 2000).

Eine weitere Klassifizierung erfolgt nach der Topographie der betroffenen Körperregionen (Nemeth, 2002). Bei der **fokalen** Dystonie sind nur einzelne Regionen betroffen, und sie kann z.B. in Form eines Blepharospasmus, der linguale Dystonie, der zervikale Dystonie, der spasmodischen Dysphonie oder des Schreib-/Musikerkrampfes auftreten. Desweiteren kann man **multifokale, segmentale** Dystonien, bei denen ganze Körperpartien betroffen sind, und **generalisierte** Dystonien (hier sind der Rumpf und Bein(e) sowie ein anderer Körperteil betroffen) differenzieren (Fahn, 1988). Besonders für die Wahl der Therapie ist diese Einteilung entscheidend (s. 2.3.3.).

Die Differenzierung in Anlehnung an das Alter, in dem die Dystonie auftritt, ist von großer Bedeutung in Hinsicht auf die Prognose für den Krankheitsverlauf primärer Dystonien. Dystonien, die im Kindesalter (**infantile** Form: 0-12 Jahre) und in der Jugend (**juvenile** Form: 13-20 Jahre) auftreten, generalisieren häufig. Bei Erwachsenen (>20 Jahre) bleiben Dystonien hingegen meist fokal begrenzt (Fahn et al., 1987; Marsden, 1988; Nemeth, 2002).

Weiterhin kann die **permanente** von der **paroxysmalen**, d.h. anfallsweisen, Dystonie unterschieden werden. Die paroxysmale Dystonie ist durch ihr periodisches Auftreten gekennzeichnet und kann gemäß ihrer Dauer und auslösenden Faktoren in vier weitere Untergruppen differenziert werden: Die (1) paroxysmale kinesiogene Choreoathetose (**PKC**), die (2) paroxysmale non-kinesiogene bzw. dystone Choreoathetose (**PDC**), die (3) paroxysmale Übungs- („exercise-“) induzierte Dystonie (PED), bei der die dystonen Attacken durch lange Phasen körperlicher Aktivität ausgelöst werden und die (4) paroxysmale „hypnogene“ Dyskinesie (PHD), die während des Schlafes auftritt (Demirkiran und Jankovic, 1995; Nemeth, 2002; Zorzi et al., 2003). Besonders bedeutsam sind hierbei die PKC und die PDC. Die **PKC** tritt meist erstmals im Kindesalter auf und wird durch plötzliche Bewegungen provoziert, während die dystonen Episoden der **PDC** durch eine Reihe von Faktoren ausgelöst oder verstärkt werden, so durch Alkohol, Koffein, Nikotin, Müdigkeit, Streß oder Angstzustände (Bhatia, 1998; Fahn, 1994; Nemeth, 2002). Die PDC wurde erstmals in einer Großfamilie beschrieben, in der mehrere Mitglieder betroffen waren (Mount und Reback, 1940). Sie ist gekennzeichnet durch Attacken von unwillkürlichen Bewegungen, die zwischen 5 min und 4 h andauern und 1- bis 3-mal täglich auftreten können. Die Frequenz des Auftretens ist im Durchschnitt jedoch geringer als bei der PKC (Bhatia, 1998; Nemeth, 2002).

In den letzten Jahren wurden Dystonien im zunehmenden Maße aufgrund von genetischen Kriterien klassifiziert, wie z.B. der Art des Erbganges und der ermittelten Genloki, welche die Erkrankungen kodieren (Nemeth, 2002). Für die generalisierte idiopathische Torsionsdystonie wurde ein Gendefekt auf dem Chromosom 9 (q32-q34) lokalisiert, welches „Torsin A“, ein „Heat-shock-Protein“, kodiert (Brassat et al., 2000; Leube et al., 1999; Matsumoto et al., 2001). Die „Dopa-responsive“ Dystonie (DRD) ist bei autosomal rezessivem Erbgang mit einer Mutation des Tyrosinhydroxylase-Gens auf dem Chromosom 11 (p15.5) assoziiert (Furukawa et al., 2001; van den Heuvel et al., 1998). Bei dominantem Erbgang der Erkrankung konnte ein Gendefekt auf dem Chromosom 14 (q11-q24.3) nachgewiesen werden. Verschiedene Mutationen wurden auf dem GCH1-Gen identifiziert, welches ein Enzym der Dopaminsynthese kodiert (Nemeth, 2002).

Die Gendefekte paroxysmaler Dystonien sind hingegen bisher nicht bekannt. Die PKC tritt häufig sporadisch auf, dennoch wird ein autosomal dominanter Erbgang mit unvollständiger Penetranz vermutet (Marsden, 1996). Erst in jüngster Zeit wurde ein Genlocus auf Chromosom 16 (p11.2-q12.1) identifiziert (Nemeth, 2002). Die **PDC** folgt einem autosomal dominanten Erbgang, der in einigen Familien eine unvollständige Penetranz aufweist. Durch Kopplungsanalysen im Zusammenhang mit dieser Erkrankung konnte ein Locus im Chromosom 2 (q) identifiziert werden (Bhatia, 1998; Fink et al., 1996; Matsuo et al., 1999). Da die identifizierte Region in der Nähe einer Gruppe von Genen, die Natrium-Kanäle kodieren, aufzufinden ist, wurde ein Zusammenhang der Pathogenese mit Ionenkanaldefekten vermutet (Bhatia, 1998).

Zusammenfassend wird deutlich, daß die idiopathische Dystonie aufgrund ihrer heterogenen Ausprägung kombiniert mit unterschiedlichen Gendefekten keine einheitliche Erkrankung darstellt (Kramer et al., 1995). Leider konnte die Identifizierung von Defektgenen bisher wenig zum Verständnis der Pathophysiologie beigetragen.

### **2.3.3. Pharmakologische und chirurgische Therapie primärer Dystonien**

Die Heterogenität des Krankheitsbildes verlangt eine stark differenzierte Therapie. Die mangelnde Kenntnis über die Pathophysiologie der primären Dystonieformen zwingt jedoch zu einer meist rein symptomatischen und empirischen Behandlung (Fahn, 1995).

Ein eindrucksvoller Fortschritt in der Behandlung von fokalen Dystonien konnte durch Injektion von **Botulinum-Toxinen**, welche die Freisetzung von Acetylcholin an der neuromuskulären Endplatte hemmen, erzielt werden (Lew, 2002). Die Wirkung hält aber nur 3 Monate an, und viele Patienten entwickeln nach wiederholter Applikation aufgrund von Ak-Bildung gegen das Botulinum-Toxin A eine Therapieresistenz (Adler et al., 2002; Jankovic et al., 2003).

Initial wird bei Patienten häufig eine Behandlung mit **L-Dopa** (ein Präkursor des Dopamins) oder **Dopaminagonisten** durchgeführt, um Patienten, die an DRD leiden (s.o.), sicher zu diagnostizieren. Patienten mit dieser Dystonieform sprechen i.d.R. schon in niedrigen Dosierungen auf diese Behandlung äußerst erfolgreich an. Die DRD stellt die einzige Dystonieform dar, die heute allein medikamentös wirksam behandelt werden kann (Nygaard, 1995). Obwohl höhere Dosierungen von L-Dopa bei einigen Patienten (ca. 12%) mit anderen Dystonieformen zu Verbesserungen des Krankheitsbildes führen, tritt bei etwa 34% der

behandelten Patienten eine Verschlimmerung der Symptomatik ein (Spinella und Sheridan, 1994). **Dopaminrezeptorantagonisten** (z.B. Bromocriptin) zeigen hingegen bei 25% aller Dystoniepatienten eine antidystone Wirkung (Fahn, 1995). Bei der idiopathischen Torsionsdystonie gelten **Anticholinergika** als effektivste Therapie (Fahn, 1995).

Auch **GABA-potenzierende** Substanzen, wie Benzodiazepine und der **GABA<sub>B</sub>-Rezeptoragonist** Baclofen, führen bei 15-20% der behandelten Patienten mit idiopathischen Dystonien zur Verbesserung der Symptomatik (Fahn, 1995). Besonders das Benzodiazepin Clonazepam zeigt bei der schwer therapierbaren PDC eine Erfolgsquote von etwa 30%. **Antikonvulsiva** (z.B. Phenytoin und Carbamazepin) sind hingegen bei der Therapie der PKD besonders wirksam (Bhatia, 1998).

In Hinblick auf die häufig enttäuschenden Resultate medikamentöser Therapien wurden schon seit Anfang der 1950er Jahre chirurgische Therapieansätze erforscht. Die Bandbreite reichte von Denervationen peripherer Nerven und intrathekalen Baclofen-Pumpen bis hin zu stereotaktischen Operationen (Kupsch et al., 2003). Bei der Behandlung von fokalen Dystonien, wie z.B. dem spasmodischen Torticollis, zeigten Langzeitstudien bei einer gezielten Denervation peripherer Nerven eine Erfolgsrate von etwa 70% (Cohen-Gadol et al., 2003). Thalamotomien bei Patienten mit primären generalisierten Dystonien zeigten hingegen bei nur 24,5% eine deutliche und anhaltende Verbesserung. Die Pallidotomie verspricht eine höhere Erfolgsrate (Yoshor et al., 2001). Beide Therapien sind jedoch nur eingeschränkt einsetzbar, da gerade bei Kindern und Jugendlichen die Läsionierung eines noch in der Entwicklung befindlichen Gehirns als sehr risikoreich gilt (Kupsch et al., 2003). Die tiefe Hirnstimulation zeigt bei Trägern des DYT1-Genes eine anhaltende Verbesserung der Symptomatik um bis zu 90% (Coubes et al., 2000). Diese Behandlungsmethode birgt jedoch mit einer Komplikationsrate von etwa 50% ein hohes Risiko (Kupsch et al., 2003).

Insgesamt ist festzustellen, daß sowohl die Heterogenität des Krankheitsbildes als auch die mangelnde Kenntnis über die Pathophysiologie der verschiedenen Dystonieformen die Effektivität der Therapie von Dystoniepatienten stark einschränkt. Die i.d.R. rein symptomatische Behandlung der fokalen Dystonien und die ausschließlich empirischen Therapieansätze bei den generalisierten Dystonieformen führen meist zu unbefriedigenden Ergebnissen. Dystonien resultieren daher meist in schweren körperlichen Behinderungen. Daher ist es von außerordentlicher Bedeutung, anhand von gut charakterisierten Tiermodellen für die jeweiligen Dystonieformen das Verständnis über diese Erkrankung zu erweitern. Die gewonnenen Kenntnisse über die Ätiopathogenese der Dystonie können neben präklinischen

Studien an Tiermodellen zu einer Entwicklung neuer Therapeutika beitragen.

#### **2.3.4. Pathophysiologie primärer Dystonien**

Unwillkürliche Muskelkontraktionen von Dystoniepatienten sind definitionsgemäß das Hauptcharakteristikum der Dystonie (Fahn, 1988). Die hierbei auftretenden schraubenartigen Bewegungen entstehen durch Kokontraktionen von agonistischen und antagonistischen Muskeln (Mink, 2003). Durch elektromyographische Untersuchungen (EMG) konnten diese Muskelkokontraktionen in wiederholt rhythmische Spasmen mit einer Dauer von 200-500 ms und in kurze, unregelmäßige Zuckungen von 100 ms Dauer differenziert werden (Rothwell, 1995). Bei fokalen und generalisierten Dystonien wurde eine verminderte reziproke Hemmung nachgewiesen (Hallett, 1993; Hallett, 1998; Vitek, 2002). Transkranielle Magnetstimulationen wiesen auf eine erhöhte kortikale motorische Erregbarkeit bei Dystoniepatienten hin (Vitek, 2002).

Der nachgewiesene Verlust der Inhibition von Hirnstammreflexen und spinalen Reflexen kann das Resultat veränderter absteigender Projektionen zu den inhibitorischen Neuronen sein, die indirekt durch die Aktivität höher geschalteter Zentren, wie den Basalganglien, moduliert werden (Richter und Löscher, 1998; Vitek, 2002). Obwohl weder durch Computertomographie noch durch Magnetresonanzstudien oder postmortale histopathologische Untersuchungen neuropathologische Veränderungen nachgewiesen werden konnten, wird die idiopathische Dystonie zu den Basalganglienerkrankungen gezählt (Marsden und Quinn, 1990). Dafür sprechen die bei sekundären Dystonien häufig vorliegenden Läsionen im Striatum, GP und/oder THA (Vitek, 2002) und die häufige Assoziation von Dystonien mit anderen Basalganglienerkrankungen wie z.B. der Parkinson'schen Krankheit und Chorea Huntington (Richter und Löscher, 1998).

Tatsächlich konnten elektrophysiologische Untersuchungen diese Annahme erhärten, denn bei Patienten mit generalisierten Dystonien wurde eine verminderte Entladungsrate von Neuronen des GPi nachgewiesen (Vitek et al., 1999). Über eine Enthemmung des THA kann so eine erhöhte Erregung des motorischen Kortex erklärt werden (vgl. Abb. 1). Paradoxerweise führen jedoch Pallidotomien zur Verbesserung der Symptomatik, ein Hinweis darauf, daß ein verändertes Entladungsmuster pallidaler Neurone eine kritische Rolle in der Pathophysiologie der Dystonie einnimmt (Vitek, 2002).

Worauf elektrophysiologische Veränderungen in den Basalganglien basieren, ist bislang unbekannt. Aufgrund verschiedener Gendefekte, eines nicht einheitlichen Krankheitsbildes (s.

2.3.2.) und einer variablen Ansprechbarkeit auf Pharmaka ist die Pathogenese offenbar heterogen.

Nur bei der DRD ist der biochemische Defekt offensichtlich ein Dopaminmangel (Nemeth, 2002). Bei anderen Formen, für die eine Wirksamkeit von Dopaminrezeptorantagonisten bekannt ist, liegt eher die Vermutung einer erhöhten dopaminergen Aktivität nahe. Untersuchungen der Zerebrospinalflüssigkeit zeigten in einer Großfamilie mit **PDC** erhöhte Monoaminspiegel während dystoner Attacken. Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit einem D<sub>2</sub>-Rezeptorliganden zeigten bei denselben Patienten keine Rezeptorveränderungen (Jarman et al., 2000). In PET-Bindungsstudien mit einem Monoamintransporter-2-Liganden konnten bei PDC-Patienten ebenfalls keine Abweichungen festgestellt werden (Bohnen et al., 1999). In einem Patienten mit PED wurde nach einer dystonen Attacke eine erhöhte Konzentration von Dopaminmetaboliten in der Zerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen (Barnett et al., 2002).

Bisher beschränken sich Überlegungen und Untersuchungen zu biochemischen Fehlfunktionen weitestgehend auf das dopaminerge System. Dopaminerge Fehlfunktionen können aber lediglich eine Folge verminderter GABAerger Inhibition sein (Richter und Löscher, 1998). Der inhibitorische Neurotransmitter GABA und exzitatorische Aminosäuren (Glutamat, Aspartat), die in den Basalganglien eine große Rolle spielen, wurden bislang kaum bei Dystoniepatienten untersucht.

Die eingeschränkten Untersuchungsmethoden und die teils (für bestimmte Dystonieformen) geringen Patientenzahlen stellen bei der Erforschung humaner Dystonien eine große Problematik dar. Klinische Studien zur pathophysiologischen Rolle der Neurotransmitter GABA oder Glutamat sind trotz ihrer außerordentlichen Bedeutung in der Steuerung motorischer Prozesse nur rar und schwer zu interpretieren (Richter und Löscher, 1998). Die Heterogenität in Symptomatik und Genetik in Kombination mit den bereits vorhandenen Untersuchungsergebnissen lassen vermuten, daß den zahlreichen Dystonieformen auch eine unterschiedliche Pathogenese zugrunde liegt. Daher sollten Untersuchungen an Humanpatienten in möglichst homogenen und gut charakterisierten Gruppen erfolgen (Spinella und Sheridan, 1994), häufig sind hierfür jedoch die Patientenzahlen zu gering. Einen Ausweg aus dieser Problematik bietet die Entwicklung und Etablierung gut charakterisierter Tiermodelle für die speziellen Dystonieformen. Hierdurch sind einerseits Untersuchungen an einer großen Anzahl von Tieren möglich, andererseits können invasive Methoden zur Erforschung einzelner Fragestellungen durchgeführt werden (Richter und Löscher, 1998).

## 2.4. Tiermodelle für primäre Dystonien

Da bis heute die pharmakologische Therapie von primären Dystonien aufgrund mangelnder Kenntnisse über die Pathophysiologie dieser Erkrankung meist enttäuschend verläuft, sind tierexperimentelle Untersuchungen unverzichtbar. Aufgrund der Heterogenität der Symptomatik von Dystonien ist davon auszugehen, daß den jeweiligen Erkrankungen auch eine unterschiedliche Pathogenese zugrunde liegt (s. 2.3.4.). Daher müssen geeignete Tiermodelle für bestimmte humane Dystonieformen klar definiert sein (Richter und Löscher, 1998), d.h. dieser jeweiligen Form im klinischen Erscheinungsbild („face validity“), in der Ansprechbarkeit auf Pharmaka („predictive validity“) sowie in den zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen („construct validity“) entsprechen (Richter und Löscher, 1998; Willner, 1997).

Grundsätzlich sind experimentell induzierte Tiermodelle von genetischen Tiermodellen für die Dystonie zu unterscheiden (Richter und Löscher, 2000). Ein Primatenmodell für die Parkinson'sche Krankheit, in dem durch L-Dopa oder Dopaminrezeptoragonisten Dyskinesien hervorgerufen werden, gilt heute als etabliertes Modell für iatrogene Dystonien (Pearce et al., 1995). Solche experimentell induzierten Störungen eignen sich jedoch weniger für die Erforschung der Pathogenese von primären Dystonien als genetische Tiermodelle (Richter und Löscher, 2000).

Angeborene Dystonien wurden bei verschiedenen Mausmutanten beschrieben. Gut charakterisierte und allgemein anerkannte genetische Tiermodelle für die Dystonie sind jedoch z.Zt. nur die *dt*-Ratte als Modell für eine permanente generalisierte Dystonie sowie der in der vorliegenden Arbeit untersuchte *dt<sup>sz</sup>*-Hamster als einziges Tiermodell für eine paroxysmale Dystonie.

### 2.4.1. Mausmutanten

Die *dt*-Maus: Die spontane, autosomal rezessiv vererbare Mutation trat in einer BALB/cBy-Mauslinie auf und konnte dem Chromosom 1 zugeordnet werden (Richter und Löscher, 2000). Im Alter von 2 Wochen zeigen die Mäuse erstmals Hyperflexionen der Hinterextremitäten und Hyperpronation der Pfoten. Mit 3-4 Wochen sind die Tiere bedingt durch schwere Ataxien, Hyperextensionen und -flexionen der Beckengliedmaßen und Drehungen des Rumpfes nicht mehr in der Lage, regelmäßig Futter und Wasser aufzunehmen



(Duchen et al., 1964). Daher ist die Lebenszeit der Tiere erheblich verkürzt und die Züchtung mit homozygoten Tieren nicht möglich (Richter und Löscher, 1998). Lichtmikroskopisch konnten axonale Schwellungen im Hirnstamm und Rückenmark, sowie eine segmentale Demyelinisierung in peripheren Nerven nachgewiesen werden (Duchen et al., 1964; Ongali et al., 2000; Sotelo und Guenet, 1988). Hierfür scheint eine Mutation des sog. Dystonin-Gens verantwortlich zu sein, welches ein Protein kodiert, daß an der Vernetzung zytoskelettaler Elemente, u.a. in Neuronen, beteiligt ist (De Repentigny et al., 2003). Aufgrund pathomorphologischer Befunde und der Symptomatik stellt die *dt*-Maus eher ein Modell für die spinozerebelläre Ataxie dar (Richter und Löscher, 1998; Sotelo und Guenet, 1988).

Die *wri*-Maus ist eine Spontanmutante der BALB/c-Inzuchtlinie. Der autosomal rezessiv vererbare Gendefekt liegt auf Chromosom 6 (Takahashi und Kitamura, 1999). Die erstmals im Alter von 10-14 Tagen auftretenden klinischen Symptome haben bis zur zwölften Lebenswoche einen progressiven Verlauf und sind entsprechend der Namensgebung (*wriggle* = sich winden) durch drehende und windende Bewegungen des Kopfes sowie Rumpfes gekennzeichnet. Sie werden begleitet von Myoklonien und einem Tremor (Ikeda et al., 1989; Kokubun, 1991). Die daraus resultierende Beeinträchtigung der Futter- und Wasseraufnahme führt auch bei dieser Mutante zu einer gestörten Vitalität und Fruchtbarkeit. Lichtmikroskopisch waren keine Veränderungen im ZNS oder in peripheren Nerven nachweisbar, elektronenmikroskopisch fiel jedoch eine Reduktion synaptischer Kontakte an den dendritischen Verzweigungen der Purkinje-Zellen des Kleinhirns auf (Kokubun, 1991). Abweichungen beim dopaminergen und GABAergen System wurden von Ikeda et al. (1989) sowohl im Striatum als auch im Kleinhirn festgestellt. Der Serotoningehalt war im Kleinhirn und sein Hauptmetabolit 5-Hydroxyindolessigsäure in allen untersuchten Hirnregionen erhöht. Ob diese Befunde jedoch sekundär durch Streß oder Störungen anderer Neurotransmittersysteme verursacht sind, bleibt zu untersuchen (Ikeda et al., 1989; Richter und Löscher, 1998; Richter und Löscher, 2000). Aufgrund fehlender elektroenzephalographischer (EEG-) und EMG-Untersuchungen erscheint die Eignung dieses Tiermodells für die idiopathische Dystonie fraglich (Richter und Löscher, 2000). Jüngere Untersuchungen zeigten, daß bei dieser Mausmutante epitheliale Defekte des Innenohrs vorliegen und sie daher zur Identifizierung von Taubheitsgenen beitragen kann (Takahashi et al., 1999).

Die *med<sup>l</sup>*-Maus: Die erste beschriebene Mutation des Genortes der *motor endplate disease* (Erkrankung der motorischen Endplatte) trat 1958 in Edingburgh auf (Duchen, 1970). Vor

einigen Jahren wurde eine *med<sup>f</sup>*-Maus mit einem Defekt des neuronalen Natriumkanalgens *Scn8a* als Tiermodell für die kinesio gene, d.h. bewegungsinduzierte Dystonie vorgeschlagen. F1-Hybride homozygoter *med<sup>f</sup>*-Mäuse aus einer Kreuzung der Linien C57BL/6J × C3HeB/FeJ zeigen anhaltende abnorme Haltungen, drehende Bewegungen des Rumpfes und der Gliedmaßen, Kopftremor sowie Muskelschwäche. Im ZNS konnten keine pathomorphologischen Veränderungen nachgewiesen werden, Veränderungen der Skelettmuskulatur deuteten jedoch auf eine verminderte Innervation hin (Kearney et al., 2002; Sprunger et al., 1999). Weitere Charakterisierungen dieses Tiermodells zeigten, daß diese Bewegungsstörungen nicht anfallsweise auftreten, sondern permanent vorhanden sind (Hamann et al., 2003). Hierüber bestätigte sich auch eine vorliegende Muskelschwäche. Da Muskelschwäche nur äußerst selten bei Dystoniepatienten auftritt (Kong et al., 2001), wird die Eignung der *med<sup>f</sup>*-Maus als Modell für die Dystonie stark in Frage gestellt.

#### 2.4.2. Die *dt*-Ratte

Die *dt*-Ratte trat 1984 als Spontanmutation innerhalb einer Sprague-Dawley-Zuchtlinie auf. Im Gegensatz zu den Mausmutanten stellt die *dt*-Ratte ein gut charakterisiertes und anerkanntes Tiermodell für die idiopathische generalisierte Dystonie dar (Lorden, 1995). Die Bewegungsstörung wird autosomal rezessiv vererbt (Naudon et al., 1998). Im Alter von 10-12 Tagen treten bei den Jungtieren die ersten Symptome in Form von schraubenartigen Bewegungen der Gliedmaßen und des Rumpfes sowie ein Torticollis auf, die in Ruhe verschwinden (Richter und Löscher, 1998). Der Krankheitsverlauf ist progressiv und führt noch vor dem Erreichen der Geschlechtsreife durch die motorisch bedingte Einschränkung der Futter- und Wasseraufnahme zum Tod (LeDoux et al., 1998). Daher erfolgt die Züchtung allein mit heterozygoten *dt*-Ratten (Richter und Löscher, 1998).

Untersuchungen zum Hirnstoffwechsel und neurochemische Studien zeigten, daß bei der *dt*-Ratte dem Kleinhirn im Gegensatz zu den Basalganglien eine zentrale Bedeutung in der Pathophysiologie der Dystonie zukommt, wobei histopathologisch keine Veränderungen im ZNS nachgewiesen werden konnten (LeDoux et al., 1995; Lorden, 1995). Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten eine erhöhte Entladungsrate von Neuronen der tiefen Kleinhirnerne (Lorden et al., 1992). Aufgrund dieser Untersuchungen wurden an den *dt*-Ratten Zerebellektomien durchgeführt, die zum vollständigen Verschwinden der dystonen Symptomatik führten (LeDoux et al., 1993). Obwohl Kleinhirnläsionen eine Ausnahme bei

symptomatischen Dystonien humaner Patienten darstellen, kann eine Beteiligung zerebellärer Dysfunktionen an der Manifestation dieser Bewegungsstörung nicht ausgeschlossen werden (Richter und Löscher, 2000).

### **2.4.3. Der $dt^{sz}$ -Hamster**

Im Jahre 1976 berichteten YOON et al. erstmals von einer Inzuchtlinie (BIO 86.93) Syrischer Goldhamster (*Mesocricetus auratus auratus*), die auf milden Streß mit tonischen Muskelspasmen und schweren paralytischen Stadien reagierte. Diese Symptome wurden als epileptische Anfälle fehlinterpretiert, was dazu führte, dass die Hamstermutante das Gensymbol *sz* (englisch: seizures) erhielt. Kreuzungsversuche konnten einen autosomal rezessiven Erbgang nachweisen. Durch Einkreuzen einer Lakeview-Inzuchtlinie (Prof. W.B.Iturrian, University of Gorgia, Athens, USA) entstand eine Sublinie (UGA 700), welche sich durch verbesserte Reproduktionsleistungen sowie eine einheitlichere Ausprägung der Bewegungsstörung auszeichnete (Fisher, 1986).

Eingehende klinische, elektrophysiologische und neuropharmakologische Untersuchungen der Hamstermutante zeigten, daß die motorischen Störungen nicht epileptischer Natur sind, sondern daß die Tiere die charakteristischen Merkmale einer PDC (s. 2.3.2.), auch kurz „paroxysmale Dystonie“ genannt, aufweisen. Daher wurde das Gensymbol  $dt^{sz}$  (*dt* für englisch: dystonic) eingeführt. Der  $dt^{sz}$ -Hamster stellt z.Zt. das einzige gut charakterisierte und anerkannte Tiermodell für eine Form der paroxysmalen Dystonie dar (Nardocci et al., 2002; Richter und Löscher, 1998).

#### 2.4.3.1. Klinisches Erscheinungsbild

Der  $dt^{sz}$ -Hamster entwickelt gelegentlich spontan, insbesondere jedoch nach Einwirkung von Streß, schraubenartige Verdrehungen an Rumpf und Gliedmaßen. Hierbei durchlaufen die Bewegungsstörungen eine Art Sequenz, die durch ein von Löscher et al. (1989) entwickeltes Scoresystem beurteilt werden kann (s. 3.2.1.1.). Jeder Hamster erreicht i.d.R. seinen individuellen maximalen Schweregrad innerhalb von 3 h und erholt sich von den dystonen Attacken in einem Zeitraum von 2-5 h (Löscher et al., 1989). Eine Verminderung oder Unterbrechung der Dystonie kann durch Schlaf ausgelöst werden (Richter und Löscher, 1998). Im EMG zeigte sich, daß die Bewegungsstörungen Ausdruck von unwillkürlichen Muskelkontraktionen sind, die unabhängig von willkürlich ausgeführten Bewegungen

auftreten. Während der bis zu wenigen Stunden andauernden Attacken konnten keine EEG-Veränderungen festgestellt werden, womit eine Abgrenzung der Bewegungsstörung zu epileptischen Anfällen möglich ist (Gernert et al., 1997; Gernert et al., 1998; Löscher et al., 1989).

**Tab. 1**

Charakteristika	Patienten	$dt^{sz}$ -Hamster
• Attacken unwillkürlicher Muskelkookontraktionen, drehende Bewegungen und Haltungen erzeugend	+	+
• Attacken dauern mehrere Stunden an	+	+
• Bewußtsein unverändert	+	+
• Auslösung durch Aufregung, Streß und Koffein	+	+
• EMG-Veränderungen	+	+
• Abwesenheit von EEG-Veränderungen	+	+
• verminderte Aktivität der Neurone des GPi bzw. EPN	+	+
• keine pathomorphologischen ZNS-Veränderungen	+	+
• antidystone Wirkung GABA-mimetischer Substanzen und Neuroleptika	+	+

**Tab. 1:** Charakteristische Merkmale der paroxysmalen dystonen Choreoathetose des Menschen, die sich beim  $dt^{sz}$ -Hamster zeigen (nach Richter und Löscher, 1998).

Die Dystonie bei den  $dt^{sz}$ -Hamstern ist durch einen charakteristischen, altersabhängigen Verlauf gekennzeichnet, bei dem die ersten Symptome etwa ab dem 16. Lebenstag durch Streß auslösbar sind. Der Schweregrad der Symptome ist am Tag des Absetzens (21. Lebenstag) sowie zwischen dem 30. und 42. Lebenstag maximal ausgeprägt. Ab der sechsten Lebenswoche erfolgt eine allmähliche Remission der Bewegungsstörungen, die ab der zehnten Lebenswoche nicht mehr durch Streß induzierbar sind (Richter und Löscher, 1993a). Eine Ausnahme bilden hochträchtige sowie säugende Weibchen, bei denen die Symptome erneut beobachtet werden konnten (Khalifa und Iturrian, 1993). Einen weiteren Hinweis darauf, daß die Dystonie bei den Hamstern nicht wirklich transient ist, konnten Untersuchungen zeigen, bei denen durch bestimmte pharmakologische Manipulationen die dystonen Attacken auch noch nach der Spontanremission ausgelöst wurden (Richter et al., 1997; Richter et al., 1994). Aufgrund der Altersabhängigkeit der Dystonie wurde ein Zusammenhang zwischen den in der Pubertät auftretenden Sexualhormonen und der

Erkrankung vermutet. Durchgeführte Gonadoektomien am Tag des Absetzens zeigten jedoch keine Veränderungen in der Ausprägung der Symptomatik (Löscher et al., 1995).

#### 2.4.3.2. Neuropathologische Untersuchungen

Neuropathologische Untersuchungen mittels lichtmikroskopischer Standardtechniken ließen bei der  $dt^{sz}$ -Mutante in Analogie zur humanen idiopathischen Dystonie keine Abweichungen der Morphologie und Morphometrie des Gehirns und Rückenmarks im Vergleich zu Kontrolltieren erkennen (Wahnschaffe et al., 1990), womit die Eignung des  $dt^{sz}$ -Hamsters als Tiermodell für eine primäre Dystonieform bestätigt wurde. Untersuchungen des Wachstums-assoziierten Protein GAP-43 zeigten ebenfalls keine Veränderungen (Burgunder et al., 1999), was gegen eine allgemeine Verzögerung der Gehirnentwicklung beim  $dt^{sz}$ -Hamster als Ursache für die Dystonie spricht. Studien zur Dichte dopaminerger Neurone und deren Nervenendigungen zeigten ebenfalls keine Abweichungen (Nobrega et al., 1999).

Die Dichte immunhistochemisch markierter striataler  $PV^+$ -Interneurone war hingegen bei den  $dt^{sz}$ -Hamstern im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie im Vergleich zu Kontrollhamstern signifikant erniedrigt (Gernert et al., 2000). Bei ca. 90 Tage alten  $dt^{sz}$ -Hamstern, bei denen aufgrund der Spontanremission der Dystonie keine Symptome mehr durch Streß auslösbar sind, wurde eine Normalisierung dieser Interneuronendichte nachgewiesen (Richter und Hamann, 2002). Ob noch weitere striatale Interneuronentypen (s. 2.2.2.) von ontogenetischen Veränderungen bei den  $dt^{sz}$ -Hamstern betroffen sind, wurde bislang nicht untersucht.

#### 2.4.3.3. Neuronale Aktivität

Untersuchungen zur neuronalen Aktivität mit Hilfe der [ $^3H$ ]2-Deoxyglukosetechnik zeigten in bestimmten Hirnregionen signifikante Abweichungen während der Ausprägung schwerer Dystonien. Im Nucleus ruber, in den ventralen thalamischen Kernen, im medialen Vestibularkern und im dorsomedialen Striatum war die Aktivität signifikant erhöht, in den tiefen zerebellären Kernen dagegen signifikant vermindert (Richter et al., 1998). Um diesen Abweichungen nachzugehen, wurden weitergehende Untersuchungen durchgeführt, welche über die Aktivität der Cytochromoxidase chronische, angeborene, regionale Veränderungen des Hirnstoffwechsels ermitteln sollten. In der SNr, im GP, Striatum, im dorsomedialen THA und in den tiefen zerebellären Kernen konnte eine verminderte Aktivität dieses Enzyms

festgestellt werden (Nobrega et al., 1998). Immunhistochemische Untersuchung der *c-fos*-Expression ergaben signifikante Veränderungen in der lateralen Habenula (Ebert et al., 1996), die Projektionen aus dem EPN erhält. Insgesamt lieferten diese genannten Untersuchungen einen Hinweis auf eine Involvierung der Basalganglien in die Pathogenese der Dystonie beim *dt<sup>sz</sup>*-Hamster, denen durch elektrophysiologische Studien weiter nachgegangen wurde (Richter und Löscher, 2002).

Mittels *in-vivo*-Einzelzelleableitungen wurde eine signifikant erhöhte Entladungsrate GABAerger Projektionsneurone im dorsomedialen Striatum bei *dt<sup>sz</sup>*-Hamstern im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie nachgewiesen (Gernert et al., 1999a). *In-vivo*-Einzelzelleableitungen an Neuronen des EPN zeigten eine verminderte Feuerrate, die sich im Alter der Spontanremission der Dystonie normalisierte (Bennay et al., 2001; Gernert et al., 2000). In der SNr wurde keine veränderte Spontanaktivität vorgefunden (Gernert et al., 1999b).

Untersuchungen des kortikostriatalen Übertragungsweges an Gehirnschnitten von *dt<sup>sz</sup>*-Hamstern mittels der Doppelpuls-Methode und der LTP zeigten eine erhöhte Erregbarkeit der kortikostriatalen Synapsen und eine verstärkte LTP in Präparaten von Tieren, die während dystoner Attacken getötet worden waren (Köhling et al., 2004). Weitere elektrophysiologische Studien in Kombination mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 deuten darauf hin, daß die erhöhte Erregbarkeit mit einer verstärkten präsynaptischen Glutamatausschüttung einherzugehen scheint (Köhling et al., 2004). Diese Ergebnisse deuten zusammen mit pharmakologischen und neurochemischen Befunden (s. 2.4.3.4.) auf eine erhöhte Aktivität des glutamatergen Systems beim *dt<sup>sz</sup>*-Hamster hin.

#### 2.4.3.4. Neuropharmakologische und neurochemische Untersuchungen

Pharmakologische sowie neurochemische Untersuchungen erlauben weiteren Aufschluß über die Funktion der Neurotransmittersysteme, wobei die Applikation von Pharmaka zusätzlich ein geeignetes Instrument darstellt, um die „predictive validity“ von Tiermodellen zu überprüfen. Die so erworbenen Kenntnisse bieten ebenfalls Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapeutika.

##### *Monoamine:*

Während sich bisher keine klaren Hinweise auf Störungen des noradrenergen und serotonergen Systems zeigten, sprechen viele Befunde für die pathophysiologische Rolle einer

temporären dopaminergen Überaktivität (Richter und Löscher, 2002). Wirkstoffe, die eine Aktivierung des dopaminergen Systems bewirken, verschlimmerten die Dystonie beim *dt<sup>sz</sup>*-Hamster (Löscher und Fredow, 1992; Nobrega et al., 1999; Rehders et al., 2000), während Dopaminrezeptorantagonisten antidyston wirkten (Löscher und Fredow, 1992; Rehders et al., 2000; Richter und Löscher, 1993b).

Messungen des Gehaltes an Dopamin und seinen Metaboliten, der Tyroxinhydroxylase-mRNA-Expression sowie immunhistochemische Studien zur Dichte von dopaminergen Neuronen zeigten keine Abweichungen bei der Hamstermutante (Burgunder et al., 1999; Löscher et al., 1994; Nobrega et al., 1999). Unter basalen Bedingungen war die Bindung am Dopamintransporter unverändert, in Anwesenheit von dystonen Attacken jedoch sowohl im Nucleus accumbens als auch in der ventralen tegmentalen Area reduziert. Dieser Befund läßt eine verminderte Anpassung der Dopaminaufnahme unter Streß vermuten (Nobrega et al., 1999). Autoradiographische Studien ergaben eine verminderte Dichte von Dopaminrezeptoren im dorsomedialen Striatum der Hamstermutante, was als Rezeptor-„down“-Regulation interpretiert wurde (Nobrega et al., 1996).

Durch lokale Manipulationen der D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptoren mittels striataler Mikroinjektionen von Dopaminrezeptoragonisten und -antagonisten bestätigte sich die Annahme einer pathogenetisch relevanten dopaminergen Überaktivität. Mikrodialysestudien, in denen der striatale extrazelluläre Dopaminspiegel der Hamstermutante in Abwesenheit und während einer dystonen Episode gemessen wurde, zeigten keine basalen Veränderungen, jedoch eine signifikante Erhöhung im Striatum dystoner Tiere (Hamann und Richter, 2004).

Insgesamt ist eine striatale dopaminerge Überaktivität offenbar entscheidend an der Manifestation dystoner Attacken der Hamstermutante beteiligt. Ob eine unter Streß zeitweilig erhöhte dopaminerge Aktivität bei der *dt<sup>sz</sup>*-Mutante lediglich das Resultat einer reduzierten GABAergen Inhibition darstellt, ist bislang ungeklärt (Hamann und Richter, 2004; Richter und Löscher, 2002).

#### *Das GABAerge System:*

Pharmakologische Manipulationen des GABAergen Systems demonstrierten eine deutliche antidystone Wirkung von GABA<sub>A</sub>-potenzierenden Wirkstoffen (z.B. Benzodiazepine, Phenobarbital). Eine Verschlimmerung provozierten hingegen Stoffe, welche die GABAerge Inhibition vermindern. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten eine Altersabhängigkeit (Fredow und Löscher, 1991; Richter und Löscher, 1998; Richter und Löscher, 2002).

Neurochemische Untersuchungen des GABAergen Systems wiesen u.a. auf eine verminderte GABAerge Inhibition im Striatum dystoner Hamster hin (Burgunder et al., 1999; Löscher und Hörstermann, 1992; Pratt et al., 1995). Durch Untersuchungen verschiedener Altersgruppen fielen eine ontogenetische Normalisierung der GABA-Spiegel striataler Gehirnhomogenate und eine Normalisierung der erhöhten Affinität von [<sup>3</sup>H]Flumazenil zur Benzodiazepin-Bindungsstelle nach Spontanremission der Dystonie bei der Mutante auf (Pratt et al., 1995). Durch lokale pharmakologische Manipulationen im Striatum wurde die pathogenetische Bedeutung einer striatalen GABAergen Disinhibition bestätigt.

Wie in Kapitel 2.4.3.2 bereits erläutert, konnte durch immunhistochemische Untersuchungen eine verminderte Dichte striataler GABAerger PV<sup>+</sup>-Interneurone im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie nachgewiesen werden, die sich nach der Spontanremission der Dystonie wieder normalisierte. Aufgrund ihrer außerordentlichen Bedeutung in der Modulation striataler Afferenzen und Hemmung GABAerger Projektionsneurone scheint somit eine verminderte GABAerge Neurotransmission innerhalb des Striatums maßgeblich an der Pathogenese der primären Dystonie dieser Hamstermutante beteiligt zu sein. Über eine daraus resultierende erhöhte thalamische Aktivität könnte nicht nur die glutamaterge Transmission zum Hirnstamm und Rückenmark, sondern auch die glutamaterge kortikostriatale Übertragung verstärkt werden. Ob andere striatale Interneuronentypen ebenfalls einer ontogenetischen Veränderung unterliegen, ist bislang nicht untersucht worden.

#### *Das glutamaterge System:*

Bisherige pharmakologische Befunde bei der *dt<sup>sz</sup>*-Mutante sprechen dafür, daß eine erhöhte Aktivität des glutamatergen Systems an der Manifestation der paroxysmalen Dystonie beteiligt ist. So erwiesen sich systemische Applikationen von N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) und  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid- (AMPA)-Rezeptorantagonisten als antidyston wirksam (Löscher und Richter, 1993; Richter et al., 1991; 1993). Ein selektiver NMDA-Rezeptorantagonist, der spezifisch an die NR2B-Untereinheit dieses Rezeptors bindet (s. 2.5.2.1.1), zeigte nach systemischer Applikation jedoch eine prodystone Wirkung (Richter, 2003). Inhibitoren der NOS, ein Enzym, das nach der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren NO freisetzt, waren nach intraperitonealer Injektion antidyston wirksam (Richter et al., 2000).

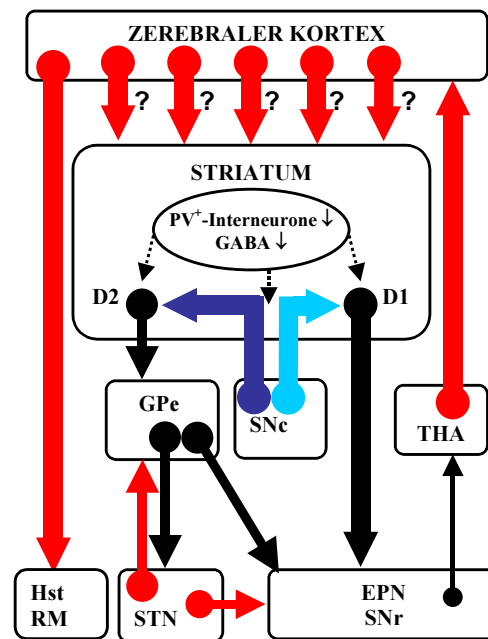
Messungen der Glutamat- und Aspartat Spiegel in Homogenaten verschiedener Gehirnregionen des *dt<sup>sz</sup>*-Hamsters ergaben keine wesentlichen Abweichungen (Löscher und Hörstermann, 1992). Kynurensäure, ein endogener Glutamatrezeptorantagonist, der eine sehr



hohe Affinität zur Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors hat, war hingegen in Homogenaten des Vorderhirns, Kleinhirns und Hirnstamms signifikant erhöht (Richter et al., 1996). Dieser Befund kann als Gegenregulation einer glutamatergen Überaktivität interpretiert werden, weil die systemische Applikation eines Kynureninhydroxylase-Inhibitors, der zu einer Erhöhung des Kynurensäurespiegels im Gehirn führt, eine antidystone Wirkung hatte (Richter und Hamann, 2003). In Gehirnhomogenaten der Hamstermutante wurden erhöhte Konzentrationen des endogenen Polyamins Spermin, ein positiver Modulator des NMDA-Rezeptors, im Vorderhirn nachgewiesen. Die systemische Applikation von Ifenprodil, einem nicht-kompetitiven Antagonisten der Polyamin-Bindungsstelle am NMDA-Rezeptor, zeigte jedoch eine prodystone Wirkung (Richter und Morrison, 2003).

Von Nobrega et al. (1997) durchgeführte autoradiographische Untersuchungen mit dem Liganden [<sup>3</sup>H]N-(1-[2-thienyl]cyclohexyl)3,4-piperidin, der an die Phenylcyclidin (PCP)-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors bindet (s. Abb. 5), zeigten nicht basal aber während einer dystonen Attacke eine signifikant erhöhte Bindung im ventrolateralen Thalamuskern und in weiteren Regionen lediglich tendenzielle Erhöhungen (Nobrega et al., 1997). Autoradiographische Untersuchungen von AMPA-Rezeptoren konnten während dystoner Attacken signifikante Abweichungen innerhalb der Basalganglien im Vergleich zu Kontrolltieren nachweisen. So zeigten sich im dorsomedialen, dorsolateralen sowie im posterioren Striatum, dem ventromedialen THA und dem frontalen Kortex von *dt<sup>sz</sup>*-Hamstern eine signifikant erniedrigte AMPA-Rezeptorbindung (Nobrega et al., 2002).

Diese Befunde deuten darauf hin, daß keine ständigen Abweichungen in der Aktivität des glutamatergen Systems vorliegen, aber unter Streßeinwirkung eine mögliche glutamaterge Überaktivität in der striato-thalamo-kortikalen Schleife zur klinischen Manifestation dystoner Attacken beiträgt (s. Abb. 3). Hierfür sprechen auch die elektrophysiologischen *in vitro*-Untersuchungen (Köhling et al., 2004), die eine veränderte kortikostriatale Übertragung beim *dt<sup>sz</sup>*-Hamster während dystoner Attacken nachweisen konnten (s. 2.4.3.3.). Da diesen Hinweisen in der vorliegenden Arbeit nachgegangen wurde, soll im nachfolgenden Kapitel das glutamaterge System genauer beschrieben werden.

**Abb. 3** Hypothese zur Pathophysiologie der paroxysmalen Dystonie beim  $dt^{sz}$ -Hamster

**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Hypothese zur Entstehung der paroxysmalen Dystonie beim  $dt^{sz}$ -Hamster (zum Vergleich mit der physiologischen Situation s. Abb. 1). Unter Streßeinfluß kann einer erhöhten nigralen dopaminergen Aktivität durch die verminderte Anzahl PV<sup>+</sup>-Interneurone nicht gegengesteuert werden. Folglich kommt es zu einer Überinhibition des EPN mit resultierender Disinhibition des THA. Hinweisen auf eine Involvierung einer erhöhten kortikostriatalen Aktivität in die Pathophysiologie der primären Dystonie bei der Hamstermutante wird in der vorliegenden Arbeit nachgegangen. Weitere Erläuterungen s. Abb. 1.

## 2.5. Exzitatorische Aminosäuren: Glutamat und Aspartat

Neben ihrer Bedeutung im Zellstoffwechsel gelten Glutamat und Aspartat als die wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter des ZNS. Im Gegensatz zum Glutamat ist Aspartat jedoch bis heute als „echter“ Neurotransmitter aufgrund widersprüchlicher Studien umstritten (Parrot et al., 2003). Über den Neurotransmitter Glutamat ist hingegen bekannt, daß er eine zentrale Rolle in Gedächtnis- und Lernprozessen einnimmt (Hardingham und Bading, 2003). Als therapeutische Zielstruktur u.a. für die Parkinson'sche Krankheit und die Epilepsie, ist er in die Pathogenese zahlreicher neurologischer Erkrankungen involviert (Spooren et al., 2001). Über die Bedeutung des glutamatergen Systems in der Pathophysiologie von Dystonien ist bis heute jedoch wenig bekannt (Nobrega et al., 2002; Richter und Löscher, 1998).

### **2.5.1. Stoffwechsel**

Glutamat ist eine Aminosäure, die aus Glukose synthetisiert wird, und aufgrund ihrer Schlüsselfunktion im Intermediärstoffwechsel ubiquitär in biologischen Systemen, besonders im ZNS, vorhanden ist. Serumglutamat kann die Blut-Hirnschranke nicht passieren (Hertz et al., 1999). Durch Synthese im ZNS werden in verschiedenen Hirnregionen hohe Spiegel von Glutamat und Aspartat erreicht (Herrera-Marschitz et al., 1996).

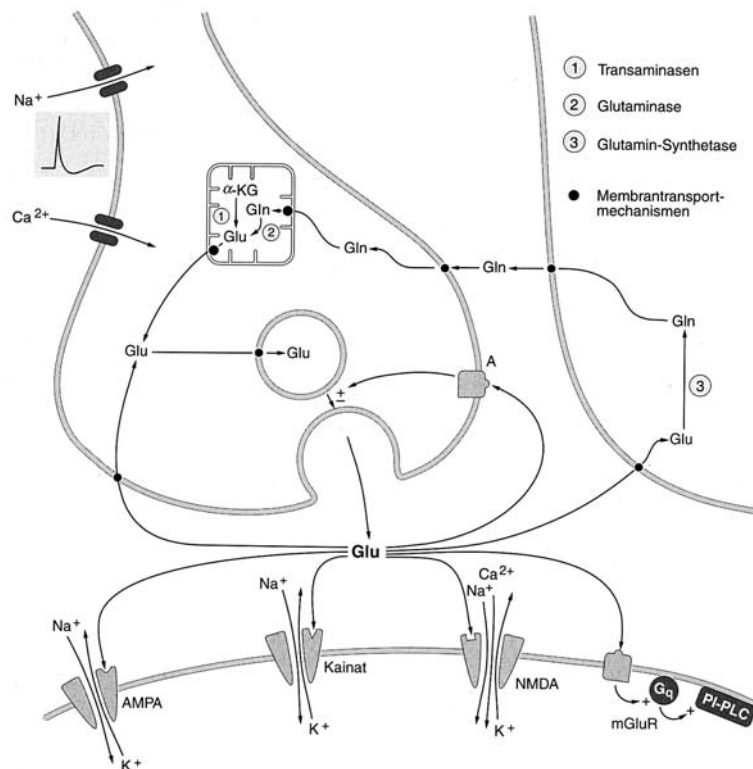
Erreicht ein elektrisches Signal die Nervenendigung, so führt die ausgelöste Depolarisation der präsynaptischen Membran zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (s. Abb. 4). Hierdurch kann das in Vesikeln gespeicherte Glutamat durch Exocytose aus den Nervenendigungen in den synaptischen Spalt freigesetzt werden (Meldrum, 2000). Eine Speicherung von Aspartat in synaptischen Vesikeln wird ebenfalls vermutet, konnte jedoch bislang nicht direkt nachgewiesen werden (Parrot et al., 2003).

Die Astrocyten sind durch ihre hohe Aufnahmekapazität hauptverantwortlich für die Glutamatwiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt, und es wird vermutet, daß nur ein geringer Prozentsatz direkt von den Nervenendigungen aufgenommen wird (Hertz et al., 1999). Bis heute sind 5 Transporter für exzitatorische Aminosäuren bekannt, welche auch für die Wiederaufnahme von Glutamat und Aspartat verantwortlich sind und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -gekoppelt arbeiten. Der in den Nervenendigungen vermutete Glutamattransporter ist noch nicht molekular identifiziert worden (Danbolt, 2001).

Das größtenteils von den Astrocyten aufgenommene Glutamat kann durch die Glutaminsynthetase zu Glutamin umgewandelt werden (s. Abb. 4). Gelangt es so in den synaptischen Spalt, löst es im Gegensatz zu Glutamat keine Rezeptoraktivität aus, gelangt über  $\text{Na}^+$ -abhängige sowie -unabhängige Transportmechanismen zurück in die Nervenendigung und kann dort durch die Glutaminase wieder zu Glutamat umgewandelt werden (Daikhin und Yudkoff, 2000; Plaitakis und Shashidharan, 2000). Zusätzlich können Astrocyten und Neurone Glutamat aus Glukose synthetisieren. Über die anaerobe Glykolyse hergestelltes Pyruvat wird hierfür nach der Umwandlung zu AcetylCoA in den Zitratzyklus eingeschleust. Das Intermediärprodukt  $\alpha$ -Ketoglutarat kann schließlich durch die Ornithin-Aminotransferase zu Glutamat umgewandelt werden. Das Enzym Pyruvatcarboxylase ist ausschließlich in Astrocyten vorhanden und sorgt durch die Synthese von Oxalacetat aus Pyruvat und Kohlendioxid für den Nachschub an Kohlenstoffgerüsten für den Zitratzyklus. In den Neuronen ist dieses Enzym hingegen nicht vorhanden, ihre Versorgung muß also durch

die Astrocyten erfolgen (Hertz et al., 1999; Smith et al., 2001).

**Abb. 4**



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Stoffwechsels und der synaptischen Übertragung von Glutamat. Die Pfeile auf der Abb. stellen Stoffbewegungen und –umwandlungen oder Beeinflussungen dar. Beeinflussungen dieser Prozesse sind durch ein + (Aktivierung) oder ein – (Hemmung) gekennzeichnet. Glutamat (Glu) wird aus  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG), einem Glied des Zitratzyklus, oder Glutamin (Gln) gebildet. Im Bild besitzt die postsynaptische Zelle 3 ionotrope Rezeptoren: AMPA-, KA- und NMDA-Rezeptoren. Außerdem gibt es metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR), die G-Protein ( $G_q$ ) –gekoppelt sind und darüber die Phospholipase C (PI-PLC) stimulieren können. Andere metabotrope Glutamatrezeptoren besitzen andere Transduktionswege. Glutamat kann seine eigene Freisetzung über präsynaptische (metabotrope) Autorezeptoren hemmen oder steigern (A). Weitere Erläuterungen im Text (Starke, 1996).

### 2.5.2. Die Glutamatrezeptoren

Die Rezeptoren der verschiedenen Neurotransmitter dienen der Signalübertragung am synaptischen Spalt. Es existieren 2 verschiedene Glutamatrezeptortypen im ZNS: die Liganden-gesteuerten Ionenkanäle (= **ionotrope Rezeptoren**), die über einen Kationeneinstrom zur Depolarisation der Nervenendigung führen und die G-Protein-gekoppelten (= **metabotropen**) Rezeptoren, welche über die Adenylatcyclase oder die Phospholipase C eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen (Smith et al., 2001).

### 2.5.2.1. Die ionotropen Glutamatrezeptoren

Bei den ionotropen Glutamatrezeptoren handelt es sich um zusammengesetzte Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und/oder Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Danysz et al., 1995), die entsprechend ihrer selektiven Agonisten in NMDA-, AMPA- und Kainat- (KA) Rezeptoren unterteilt werden können (Dingledine et al., 1999). In ihrer Funktion unterscheidet man die NMDA-Rezeptoren von den Nicht-NMDA-Rezeptoren (Lees, 2000).

#### *2.5.2.1.1. Der NMDA-Rezeptor*

Die Benennung dieses Rezeptors erfolgte nach dem für ihn hochpotenten Agonisten NMDA (Dingledine et al., 1999). Die Untereinheiten des NMDA-Rezeptors sind in allen Gehirnregionen aufzufinden (Mori und Mishina, 1995). Es wird davon ausgegangen, daß der NMDA-Rezeptor eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl neuronaler Prozesse einnimmt, so z.B. der LTP und LTD, dem Lernen und Gedächtnis, der neuronalen Differenzierung, der Neurodegeneration sowie der Motorik (Hardingham und Bading, 2003; Monaghan et al., 1998; Sheng und Kim, 2002).

NMDA-Rezeptoren sind jeweils aus 4 Untereinheiten zusammen gesetzt, die wiederum aus 2 Hauptfamilien stammen (Danysz und Parsons, 1998). Die Benennung der Untereinheiten ist artspezifisch, man unterscheidet beim Menschen sowie bei den Ratten die NMDA-R1 = NR1-Untereinheit von den NMDA-R2 (A-D) = NR2 (A-D)-Untereinheiten (s. Abb. 5), welche der Glu $\zeta$ -Untereinheit sowie den Glu $\epsilon$  (1-4)- Untereinheiten der Maus entsprechen (Mori und Mishina, 1995). Die verschiedenen Untereinheiten besitzen ein extrazelluläres Aminoende mit einem S1-Abschnitt und 4 hydrophoben Abschnitten (M1-M4), von denen 3 Segmente (M1, M3 und M4) eine transmembrane Lokalisation haben. Zwischen den Segmenten M3 und M4 befindet sich eine extrazelluläre Schleifenregion (S2-Segment) und das intrazelluläre Carboxylende der Untereinheiten reicht in das Zellinnere (Qian und Johnson, 2002).

Das Vorkommen der verschiedenen Untereinheiten ist sowohl von der Hirnregion, als auch von den unterschiedlichen Neuronentypen abhängig (Kuppenbender et al., 2000; Mori und Mishina, 1995). So finden die Untereinheiten NR1 und NR2B eine starke Verbreitung im Neostriatum (Mori und Mishina, 1995). Wie in *Tab. 2* aufgelistet, konnte auf den verschiedenen Neuronentypen des humanen Neostriatums eine unterschiedliche Zusammensetzung der NMDA-Untereinheiten nachgewiesen werden. Die stärkste Verbreitung sowohl auf den Projektionsneuronen als auch auf den verschiedenen

Interneuronentypen zeigten die Untereinheiten NR1 und NR2B (Küppenbender et al., 2000). Der NMDA-Rezeptor ist nur dann funktionstüchtig, wenn er aus mindestens einer NR1- und einer NR2- Untereinheit besteht (Mori und Mishina, 1995). Die Kombination der verschiedenen Untereinheiten bestimmt die Öffnungseigenschaften, die  $Mg^{2+}$ -empfindlichkeit und das pharmakologische Profil des Rezeptors (Danysz und Parsons, 1998; Monaghan et al., 1998; Nankai et al., 1998).

Tab. 2

**A. Vorkommen der NMDA-Untereinheiten im Neostriatum**

NMDA- Untereinheiten	GABAerge Projektionsneurone		Interneurone (Somatostatin/cholinerg)
	(Enkephalin)	(Dynorphin, Substanz P)	
NR1	++	++	++
NR2A	(+)	+	-/-
NR2B	++	++	++
NR2C	(+)	(+)	(+)/+
NR2D	(-)	(+)	+/+

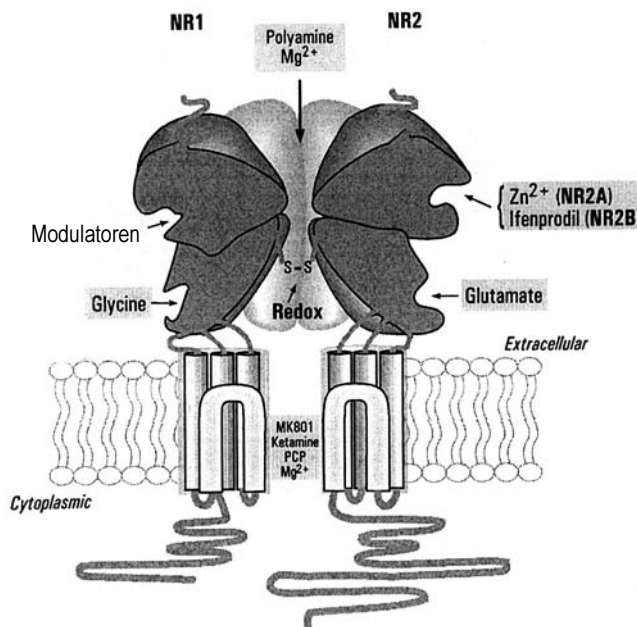
**B. Vorkommen der AMPA-Untereinheiten im Neostriatum**

AMPA-R- Untereinheiten	Projektions- neurone	Interneurone		
		PV <sup>+</sup>	cholinerg	NOS <sup>+</sup>
GluR1	+	++	+	(+)
GuR2/3	+	++	-	(+)
GluR4	-	++	+	-

**Tab. 2:** Aufgelistet sind die nachgewiesenen Untereinheiten von NMDA-Rezeptoren (A) und AMPA-Rezeptoren (B) auf den unterschiedlichen Zelltypen des Neostriatum von Menschen (A) bzw. Ratten (B). Die GABAergen Projektionsneurone des direkten Weges enthalten Dynorphin und Substanz P, die des indirekten Weges Enkephalin (s. 2.2.1.). Die striatalen Interneurone lassen sich differenzieren in PV<sup>+</sup>, cholinerg und NOS<sup>+</sup>-Interneurone (s. 2.2.2.). Die Anzahl der Kreuze entspricht der nachgewiesenen Verbreitung (++ starke Verbreitung, + mittelstarke Verbreitung, (+) geringe Verbreitung, - nicht nachweisbar). Die Tabellen wurden erstellt in Anlehnung an die Untersuchungen von Küppenbender et al. (2000) und Bernard et al. (1997).

Als pharmakologisch relevante Bindungsstellen unterscheidet man die Glutamat-, die Glycin-Bindungsstelle und den Ionenkanal. Desweiteren existieren Bindungsstellen für positive und negative Modulatoren (Danysz und Parsons, 1998), wie nachfolgend beschrieben.

Abb. 5



**Abb. 5:** Modell eines NMDA-Rezeptors mit potentiellen Bindungsstellen für Substanzen. Der extrazelluläre Anteil, bestehend aus dem Aminoende und dem S2-Segment, beinhaltet 2 venusmuschelartige Domänen pro Untereinheit, jeweils für die Agonisten- bzw. Modulatoren-Bindungsstellen. Der endogene Ligand für die modulatorische Domäne der NR2A-Untereinheit scheint Zn<sup>2+</sup> zu sein. Die Bindungsstelle für Ifenprodil-ähnliche Substanzen befindet sich auf NR2B-Untereinheiten. Zusätzlich zur Kanal-blockierenden Wirkung scheint Mg<sup>2+</sup> ein endogener Ligand für die Polyamin-Modulation-Bindungsstelle zu sein (nach Kemp und McKernan, 2002).

#### a) Die Glutamat-Bindungsstelle

Vermutlich wird die Bindungsregion sowohl für das Glutamat als auch für das Glycin von den S1- und S2-Regionen der Untereinheiten gebildet. Nach heutigem Kenntnisstand werden NMDA-Rezeptoren erst durch die Bindung von 2 Glutamatmolekülen an die NR2-Untereinheiten *eines* Rezeptors aktiviert (Danysz und Parsons, 1998). Laut Monaghan et al. (1998) zeigen Agonisten dieser Bindungsstelle eine bevorzugte Affinität zu NR2B-enthaltenden Glutamatrezeptoren, wohingegen die meisten Antagonisten, wie z.B. das D-2-Amino-5-phosphonopentanoat (AP-5) und die D-3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)-1-phosphonsäure (D-CPP), bevorzugt an NR2A-enthaltenden Glutamatrezeptoren binden.

An die Glutamat-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors binden als kompetitive Antagonisten u.a. AP-5, D-CPP und *cis*-4-[Phosphomethyl]-piperidine-2-carboxylsäure (Magnusson, 1998), wovon AP-5 die Blut-Hirnschranke nicht passieren kann. Die striatale Applikation dieser Substanzen löst ein vermehrtes Schnüffeln und eine ausgeprägte Lokomotion aus (Schmidt und Kretschmer, 1997).

## b) Die Glycin-Bindungsstelle

An den NMDA-Rezeptor müssen zusätzlich zum Glutamat 2 Moleküle des Koagonisten Glycin an eine NR1-Untereinheit binden, um eine Ionenkanal-Öffnung zu initiieren (Danysz und Parsons, 1998).

Als Agonisten der Glycin-Bindungsstelle gelten D-Serin, D-Cycloserin und D-Alanin (Danysz und Parsons, 1998; Magnusson, 1998). Eine antagonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor entfalten u.a. die endogen vorkommende **Kynurensäure** mit ihren synthetischen Derivaten, wie z.B. der 7-Chlorokynurensäure, und der partielle Agonist mit geringer intrinsischer Aktivität (*R*)-(+)-3-Amino-1-hydroxypyrrolidin-2-on (**HA-966**) (Danysz und Parsons, 1998; Magnusson, 1998). Einige Autoren berichten, daß unter bestimmten Bedingungen die Konzentration der Kynurensäure im Gehirn so stark ansteigen kann, daß die Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors wirkungsvoll blockiert wird (Moroni et al., 1988; Wu et al., 1992). Die oben genannten Antagonisten bewirken eine Reduzierung des Lernvermögens, Ataxien, Muskelrelaxierung sowie Anxiolyse (Danysz und Parsons, 1998; Morrow et al., 1999).

## c) Der Ionenkanal

Der Ionenkanal wird von allen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors gebildet und deren M2-Region scheint hauptverantwortlich für dessen Eigenschaften zu sein (Mori und Mishina, 1995). Der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors ist an der nicht-depolarisierten Membran durch  $Mg^{2+}$ -Ionen blockiert (Danysz et al., 1995; Magnusson, 1998). Zu den Ionenkanalblockern zählen Ketamin, PCP sowie das Dizozilpin (5*R*,10*S*)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclo-hepten-5,10-imin (MK-801), die eine psychotische Wirkung beim Menschen entfalten. **Ketamin** zählt zu den „dissoziativen“ Anaesthetika (Rang et al., 2003). **PCP** und **MK-801** werden den hochaffinen Kanalblockern zugeordnet. Aufgrund seiner halluzinogenen Wirkungen wird PCP auch mißbräuchlich verwendet (Rang et al., 2003). In der Forschung wird es hingegen kaum eingesetzt, da es ebenfalls mit Dopamintransportern und anderen Neurotransmittersystemen interagiert (Rang et al., 2003; Schmidt und Kretschmer, 1997). Es induziert ebenso wie das **MK-801** eine dosisabhängige Ataxie (Hiramatsu et al., 1989). **MK-801** erzeugt nach systemischer Applikation eine starke Hyperlokomotion und Stereotypien bei Nagern (Schmidt und Kretschmer, 1997).

Die später entwickelten niedrigaffinen Kanalblocker wie das **Memantin** haben einen geringeren Einfluß auf die Lokomotion, besitzen daher eine größere therapeutische Breite und



werden heute in der Therapie der Alzheimer'schen Krankheit und des Schlaganfalls eingesetzt (Culmsee et al., 2004; Finucane, 2004; Kemp und McKernan, 2002).

d) Andere Bindungsstellen

Weitere NMDA-Rezeptor-Bindungsstellen sind für Polyamine, Ifenprodil, Protonen, Redoxreagenten und  $Zn^{2+}$ -Ionen bekannt (Kemp und McKernan, 2002; Magnusson, 1998). Die positiv modulierenden **Polyamine**, wie das endogene Spermin, und die teils inhibitorisch wirkenden **ifenprodilartigen** Substanzen zeigen eine hohe Affinität zur NR2B-Untereinheit (Zhang und Shi, 2001). Die Bindungsstellen dieser Substanzen liegen in unmittelbarer Nachbarschaft (Monaghan et al., 1998).  **$Zn^{2+}$ -Ionen** stellen potente und selektive Inhibitoren der NR2A-Untereinheiten dar, in höheren Konzentrationen weitet sich diese Eigenschaft auch auf die NR2B- und NR2C-Untereinheiten aus (Monaghan et al., 1998). **Protonen** haben einen inhibitorischen Einfluß, Redoxreagenten (wie z.B. das Dithiotreitol) einen potenzierenden Einfluß auf die NMDA-Rezeptoren (Mori und Mishina, 1995).

*Funktion des NMDA-Rezeptors*

In physiologischen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen wird der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors blockiert. Diese Blockade kann nur durch eine vorangegangene partielle Depolarisation der Zellmembran, z.B. durch die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren, aufgehoben werden. Erst dann führt die Bindung des Glutamats und des Koagonisten Glycins über eine Konformationsänderung des Ionenkanals zum Einstrom von  $Na^{+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen in die Zelle mit der Folge einer Depolarisation der Zellmembran und einer  $Ca^{2+}$ -bedingten Aktivierung intrazellulärer Enzyme, wie der Phospholipase C, Phospholipase  $A_2$ , Kinase C und NOS (Hardingham und Bading, 2003; Mori und Mishina, 1995; Qian und Johnson, 2002). Die NMDA-Rezeptor-vermittelte Neurotransmission ist relativ langsam und lang anhaltend (Ozawa et al., 1998). Wie schon in Kapitel 2.2.2.1. beschrieben, kann über einen  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-gekoppelten Prozeß die NOS aktiviert werden, welche zur NO-Freisetzung führt (Bogdanov und Wurtman, 1997). Über diesen Mechanismus erfolgt ein Großteil der Wirkung der NMDA-Rezeptoren auf andere Neurotransmittersysteme. So wird davon ausgegangen, daß über NO die striatale Dopamin-, Glutamat- und Acetylcholinfreisetzung erhöht wird (Bogdanov und Wurtman, 1997; Buchholzer und Klein, 2002; West und Galloway, 1997b).

Unter neuropathologischen Bedingungen kann NO mit entstandenen Superoxiden das hochneurotoxische Peroxynitrit bilden (Deckel et al., 2002). Auch eine verstärkte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren kann über Erhöhung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels in

Nervenzellen zu einer Depolarisation von Mitochondrienmembranen und zum Zelltod führen (Hardingham und Bading, 2003).

#### *2.5.2.1.2. Die Nicht-NMDA-Rezeptoren*

Zu den Nicht-NMDA-Rezeptoren gehören die AMPA- und die KA-Rezeptoren. Die glutamaterge Aktivierung von AMPA-Rezeptoren vermittelt vermutlich einen Großteil der schnellen synaptischen Übertragung im Gehirn, während die Transmission durch KA-Rezeptoren nur einen kleinen Anteil beisteuert (Lees, 2000).

##### a) AMPA-Rezeptoren

In allen Gehirnregionen von Säugetieren sind Untereinheiten des AMPA-Rezeptors in unterschiedlicher Zusammensetzung und Verbreitung lokalisiert (Beneyto und Meador-Woodruff, 2004; Bernard et al., 1997). Die AMPA-Rezeptoren gelten als therapeutische Zielstruktur für verschiedene neurologische Erkrankungen, so Epilepsie, Demenz, Alzheimer'sche Krankheit, Schizophrenie und motorische Störungen (Franciosi, 2001; Lees, 2000).

Die AMPA-Rezeptoren sind Membranglykoproteine, die vermutlich ein Tetramer bilden, und von denen man die Untereinheiten GluR1 bis GluR4 (bzw. GluR-A bis Glu-D) unterscheiden kann (Dingledine et al., 1999; Lees, 2000). Der Aufbau der Untereinheiten ähnelt stark der Struktur der NMDA-Rezeptoruntereinheiten. Sie besitzen ebenfalls 3 transmembrane Regionen (M1, M2 und M3). Die Liganden-bindenden Schleifenregionen S1 und S2 befinden sich extrazellulär (Dingledine et al., 1999). Charakteristisch und funktionell bedeutend sind die sog. Q/R-Region des M2-Segmentes und die Flip/Flop-Region. Erstere ist ausschließlich in Glu2-Untereinheiten zu finden und reduziert die  $Ca^{2+}$ -Permeabilität des Ionenkanals. Die Flip-Flop-Region kann durch eine veränderte Aminosäuresequenz die elektrophysiologischen sowie die Bindungseigenschaften des AMPA-Rezeptors beeinflussen (Lees, 2000). So wird deutlich, daß auch beim AMPA-Rezeptor die Zusammensetzung der Untereinheiten entscheidend für die Eigenschaften des Rezeptors ist.

Die Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren ist sowohl regional als auch vom Zelltyp abhängig (Beneyto und Meador-Woodruff, 2004; Bernard et al., 1997). Beim Affen konnte eine Expression von AMPA-Rezeptoruntereinheiten in allen Hirnregionen nachgewiesen werden, die Verteilung bezüglich der Untereinheit ist jedoch variabel. So war die Expression der GluR1-Untereinheit in allen untersuchten Hirnregionen nachweisbar, die Untereinheit

GluR4 nur in einigen Bereichen (Beneyto und Meador-Woodruff, 2004). Wie in *Tab. 2* dargestellt, konnte im Neostriatum von Ratten eine unterschiedliche Verbreitung der AMPA-Rezeptoruntereinheiten auf den Neuronen festgestellt werden. Eine starke Verbreitung aller Untereinheiten zeigte sich auf den PV<sup>+</sup>-Interneuronen. Auf den Projektionsneuronen war hingegen nur eine mittelstarke Verbreitung der Untereinheiten GluR1, GluR2 und GluR3 nachweisbar (Bernard et al., 1997).

Der AMPA-Rezeptor ist im Gegensatz zum NMDA-Rezeptor auch funktionstüchtig, wenn er aus 4 gleichen Untereinheiten aufgebaut ist (Hennegriff et al., 1997). Die Zusammensetzung der verschiedenen Untereinheiten bestimmt jedoch auch bei ihm eine Reihe physiologischer Eigenschaften, so u.a. die Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität, die Öffnungseigenschaften und die Rezeptorumsatzrate in der postsynaptischen Membran (Beneyto und Meador-Woodruff, 2004).

### *Funktion*

AMPA-Rezeptoren vermitteln im Gegensatz zu den NMDA-Rezeptoren eine schnelle exzitatorische Übertragung (Johansen et al., 2003). Ihre Aktivierung führt über eine Konformationsänderung zu einer Öffnung des Ionenkanals, der für einwertige Kationen permeabel ist, so daß der dem Konzentrationsgradienten folgende Na<sup>+</sup>-Einstrom eine Depolarisation der Zellmembran bewirkt. Die Repolarisation erfolgt durch einen K<sup>+</sup>-Ausstrom. Nach ihrer Aktivierung verbleiben die Rezeptoren vorübergehend in einem desensibilisierten Zustand, in welchem der Agonist noch gebunden, der Ionenkanal jedoch wieder geschlossen ist (Johansen et al., 2003). Einige AMPA-Rezeptoren sind ebenfalls für Ca<sup>2+</sup>-Ionen durchgängig (Lees, 2000) und können durch ihre Aktivierung eine intrazelluläre Signalkaskade über Ca<sup>2+</sup>-abhängige Enzyme in Kraft setzen.

Im Gegensatz zu NMDA-Rezeptoren unterliegen die AMPA-Rezeptoren einem dynamisch regulierten Prozeß, in welchem sie aktivitätsabhängig in die Membran ein- oder ausgeschleust werden. Dieser Vorgang wird durch Interaktionen zwischen bestimmten Untereinheiten und Proteinen reguliert und nimmt eine wichtige Rolle in der Ausbildung der synaptischen Plastizität ein (Beneyto und Meador-Woodruff, 2004; Turrigiano, 2000).

Zur Aktivierung des AMPA-Rezeptors ist die Bindung von 2 Glutamatmolekülen notwendig (Clements et al., 1998). Positive Modulatoren des AMPA-Rezeptors sind die sog. **AMPA-kine**. Sie stabilisieren die Untereinheiten des AMPA-Rezeptors oder können die Desensibilisierungsphase, welche durch Agonisten-Bindung ausgelöst wird, verkürzen. Zu

diesen Substanzen zählen das Aniracetam, die Zyklothiazide und die Benzylpiperidine, wovon letztere eine Verbesserung der Gedächtnisleistung bei alternden Ratten hervorrufen konnten (Johansen et al., 2003).

Die Quinoxalin-2,3-dione und ihre Derivate sind z.Zt. die wichtigste und potenteste Gruppe **kompetitiver AMPA/KA-Rezeptorantagonisten**, sie binden jedoch ebenfalls mit hoher Wirksamkeit an die Glycin-Bindungsstelle der NMDA-Rezeptoren (Lees, 2000). Während die früheren Antagonisten nur schwach zwischen den AMPA- und KA- Bindungsstellen differenzieren konnten (Wilding und Huettner, 1996), sind die neueren Antagonisten potenter und selektiver. Die Substanz 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzol(f)quinoxalin (**NBQX**) besitzt eine etwa 30- bis 60-fach höhere Affinität zu AMPA-Rezeptoren als zu NMDA-Rezeptoren und keine signifikante Affinität zur Glycin-Bindungsstelle. Nach systemischer Applikation kann NBQX zu Störungen im Lernverhalten, Ataxien und einer Hypo- bzw. Hyperlokomotion führen (Fletcher und Lodge, 1996; Lees, 2000; Richter et al., 1993).

Die Entdeckung der 2,3-Benzodiazepine führte aufgrund ihrer hohen Affinität zu den AMPA-Rezeptoren zum größten Durchbruch bezüglich der Unterscheidung von AMPA- und KA-Rezeptoren (Lees, 2000). Der genaue Wirkungsmechanismus dieser Substanzen ist nicht bekannt, sie beeinflussen jedoch weder die Rezeptordeaktivierung noch die Desensibilisierungsphase (Donevan und Rogawski, 1998; Rammes et al., 1998). Versuchssubstanzen aus dieser Gruppe sind jedoch insgesamt nicht gut verträglich und daher nicht aussichtsreich für den therapeutischen Einsatz (Lees, 2000).

Neurosteroiden wie das Pregnenolonsulfat hemmen AMPA- und KA-Rezeptoren, sie haben jedoch zusätzlich Wirkungen auf zahlreiche andere Neurotransmittersysteme (Lees, 2000).

Zu den **Ionenkanalblockern** zählen in erster Linie die **Polyamine**, daneben auch einige Spinnen- und Wespentoxine (Lees, 2000). Diese Substanzen binden im Inneren des Ionenkanals und verhindern einen Ionenfluß. Einige Toxine, so z.B. das Joro-Spinnentoxin, scheinen selektive Blocker für  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA-Rezeptoren zu sein (Fletcher und Lodge, 1996).

## b) KA-Rezeptoren

Der Begriff „Nicht-NMDA-Rezeptoren“, der die AMPA- und KA-Rezeptoren zu einer gemeinsamen Gruppe zusammenfaßt, deutet auf ihre Verwandtschaft hin. Die pharmakologische Unterscheidung von KA- und AMPA-Rezeptoren ist erst seit kurzer Zeit

möglich (s.o.), und in vielen Artikeln werden diese Rezeptoren gemeinsam abgehandelt (Lees, 2000).

Die Zusammensetzung des Rezeptors erfolgt durch 5 verschiedene Untereinheiten, den (GluR5-7)-Untereinheiten und der KA1- sowie der KA2-Untereinheit (Borges und Dingledine, 1998). Auch bei diesem Rezeptor hängen die pharmakologischen Eigenschaften von der Kombination der Untereinheiten ab (Chittajallu et al., 1999; Heath und Shaw, 2002). Es wird davon ausgegangen, daß die KA-Rezeptoren an der Vermittlung schneller exzitatorischer Neurotransmission beteiligt sind und modulierend auf die Transmitterfreisetzung an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen in verschiedenen Gehirnregionen einwirken (Lerma, 2003). Die exakte funktionelle Rolle dieses Rezeptortyps wird jedoch weiterhin diskutiert (Heath und Shaw, 2002; Lerma, 2003).

#### 2.5.2.2. Die metabotropen Glutamatrezeptoren

Die 8 metabotropen Glutamatrezeptoren (mGlu1-8) sind in ihrer Funktion an ein G-Protein gekoppelt und werden gemäß ihrer Sequenzhomologie und ihrem Funktionsmechanismus sowie ihren pharmakologischen Eigenschaften in 3 Gruppen unterteilt (Rouse et al., 2000). Zu der *Gruppe I* zählen die Rezeptoren mGlu1 und mGlu5, deren Stimulation eine Aktivierung der Phospholipase C bewirkt. Zur *Gruppe II* gehören die Rezeptoren mGlu2 und mGlu3, die negativ mit der Adenylatcyclase gekoppelt sind. Der *Gruppe III* werden die Rezeptoren mGlu4 und mGlu6 bis 8 zugeordnet, deren Aktivierung eine Hemmung der Adenylatcyclase bewirkt (Cartmell und Schoepp, 2000).

Durch die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen und Lokalisationen der metabotropen Rezeptoren sind ihre Effekte sowohl auf das glutamaterge als auch auf andere Neurotransmittersysteme vielfältig. Ihr vermutlich eher modulierender Einfluß stellt ein therapeutischer Ansatzpunkt für eine neue Generation von Glutamatrezeptorantagonisten dar, der auf geringere Nebenwirkungen hoffen läßt (Cartmell und Schoepp, 2000; Rouse et al., 2000; Spooren et al., 2001).

### 2.5.3. Das glutamaterge System in der Pathogenese von Basalganglienerkrankungen

Wie in Kapitel 2.1. näher erläutert, können Fehlfunktionen innerhalb der Basalganglien u.a. zu schweren motorischen Störungen führen. Durch die Vermittlung sowohl der kortikostriatalen als auch der thalamokortikalen Projektionen nimmt das Glutamat gerade in den Basalganglien eine bedeutende Rolle ein. Bei zahlreichen motorischen Erkrankungen wird eine Involvierung des glutamatergen Systems vermutet oder konnte bereits nachgewiesen werden (Lees, 2000).

So führt der Dopaminmangel bei der **Parkinson'schen Krankheit** (s. 2.1.) zu einer verstärkten glutamatergen Transmission vom STN zum GPi. Daher könnten, alternativ zu den teils stark mit Nebenwirkungen belasteten Dopaminagonisten und Präkursoren, zur symptomatischen Behandlung dieser Erkrankung auch Glutamatrezeptorantagonisten synergistisch mit niedriger dosierten herkömmlichen Therapeutika eingesetzt werden (Danysz et al., 1995; Rouse et al., 2000). Aufgrund der vermeintlich geringeren Nebenwirkungen gelten die Antagonisten metabotroper Glutamatrezeptoren als vielversprechend für die Behandlung der Parkinson'schen Krankheit (Breysse et al., 2003; Rouse et al., 2000).

Bei der zu den hyperkinetischen Bewegungsstörungen gehörenden **Huntington'schen Krankheit** konnte ein selektives Sterben striataler Projektionsneurone festgestellt werden (Sun et al., 2001). Es wird vermutet, daß eine erhöhte glutamaterge Aktivität innerhalb der Basalganglien über eine NMDA-Rezeptor-vermittelte Neurotoxizität für dieses Phänomen verantwortlich sein könnte (s. 2.5.2.1.1.) (Lucetti et al., 2002). Tatsächlich konnte die Verabreichung von Amantadin, einem unselektiven nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten, eine signifikante Linderung der Symptomatik bewirken (Lucetti et al., 2003).

In der Pathogenese der **primären Dystonien** werden ebenfalls biochemische Dysfunktionen innerhalb der Basalganglien vermutet (Richter und Löscher, 1998). Wie in Kapitel 2.3. bereits erläutert, konnte bei Untersuchungen an Humanpatienten mit generalisierten Dystonien eine verminderte Entladungsrate von Neuronen des GPi nachgewiesen werden (Vitek et al., 1999). Dieser Befund deckt sich mit Untersuchungen am *dt<sup>sz</sup>*-Hamster, einem Tiermodell für die primäre paroxysmale Dystonie (Gernert et al., 2000).

## **2.6. Fragestellungen der vorliegenden Arbeit und Auswahl der applizierten Substanzen**

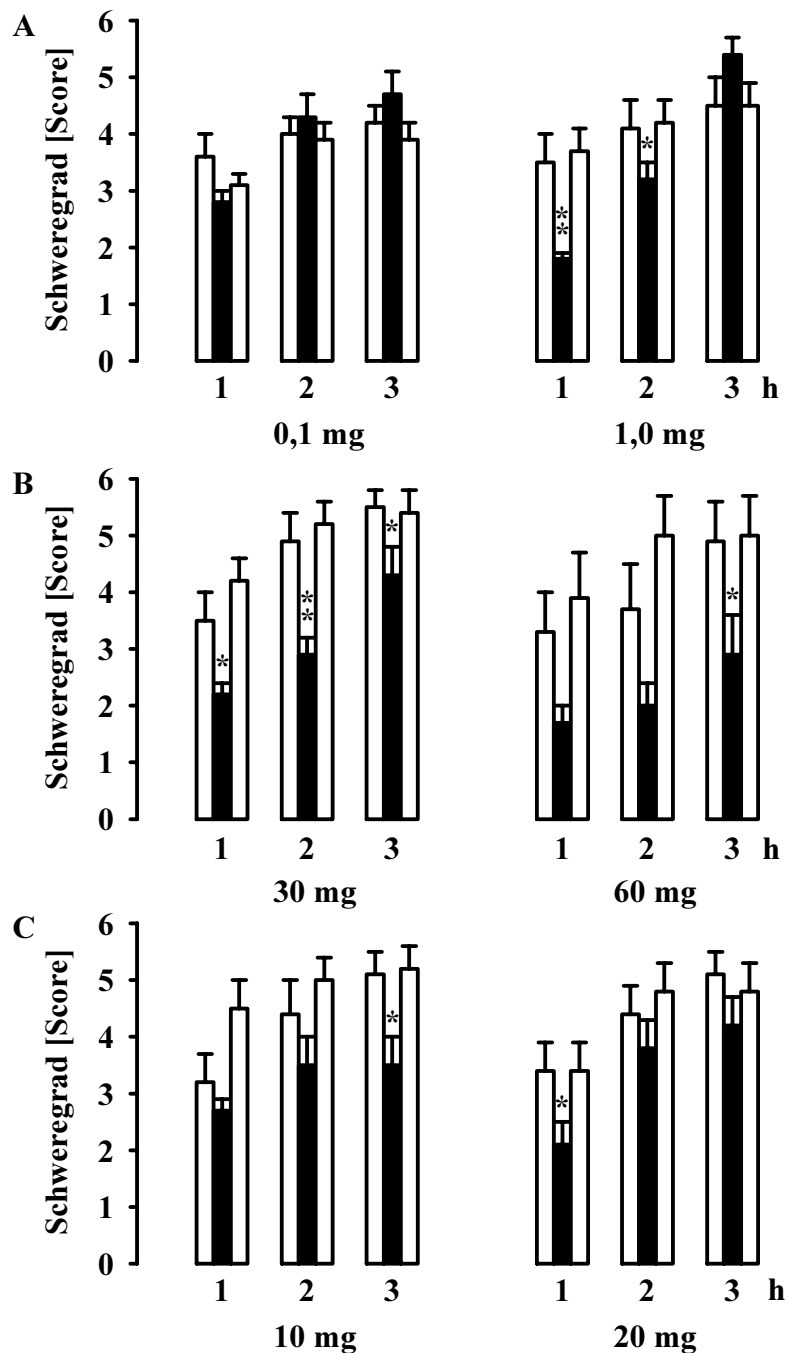
### **2.6.1. Striatale Manipulation von Glutamatrezeptoren**

Sowohl die elektrophysiologischen Untersuchungen von Köhling et al. (2004) als auch die AMPA-Rezeptorautoradiographie (Nobrega et al., 2002) beim  $dt^{sz}$ -Hamster wiesen darauf hin, daß eine erhöhte kortikostriatale glutamaterge Aktivität an der Manifestation dystoner Attacken beteiligt ist. Diese Untersuchungen wurden jedoch nicht *in vivo* durchgeführt. Die systemische Applikation von Glutamatrezeptorantagonisten (s. 2.4.3.4.) läßt keine Aussage darüber zu, ob intra- oder extrastriatale Glutamatrezeptorblockaden für die antidystone Wirkung dieser Substanzen entscheidend waren. Um der pathophysiologischen Bedeutung des striatalen glutamatergen Systems beim  $dt^{sz}$ -Hamster nachzugehen, wurden daher lokale Applikationen von Glutamatrezeptorantagonisten in das Striatum im Rahmen der Dissertation durchgeführt.

Die Substanzauswahl erfolgte in Anlehnung an die bereits an der Hamstermutante durchgeführten systemischen Applikationen von Glutamatrezeptorantagonisten, welche eine antidystone Wirkung entwickelten (Löscher und Richter, 1993; Richter et al., 1991; 1993). Die Wirkungen einiger Antagonisten sind beispielhaft in Abb. 6 dargestellt. Durch die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen intrastriatalen Injektionen dieser Substanzen sind direkte Vergleiche der Effekte mit denen früherer Befunde nach systemischer Gabe möglich. Ein weiteres Kriterium stellte die Selektivität der Substanzen und die Manipulation möglichst verschiedener Bindungsstellen dar (s. 2.5.). Um neurotoxische Wirkungen oder Verhaltenseffekte durch Vehikel zu vermeiden, wurden nur Substanzen appliziert, die in den nötigen Konzentrationen in isotoner Kochsalzlösung (NaCl-Lösung) gelöst werden konnten. Die Auswahl der Dosierungen der einzelnen Substanzen erfolgte in Anlehnung an Literaturangaben für Ratten bzw. Hamster (s. Tab. 3), bei denen durch die lokale Applikation der Wirkstoffe in verschiedenen Gehirnregionen typische Verhaltenseffekte hervorgerufen wurden (s.u.). Konnten keine Literaturangaben zu striatalen Applikationen gefunden werden, so wurde auf Dosierungsangaben für andere Gehirnregionen bei Nagern ausgewichen.

Die Substanzwahl beschränkte sich auf **Glutamatrezeptorantagonisten**, da Glutamatrezeptoragonisten und Glutamatwiederaufnahme-Inhibitoren eine neurotoxische und prokonvulsive Wirkung haben (Motles et al., 2002; Okazaki et al., 1996).

Abb. 6



**Abb. 6:** Wirkung der systemisch applizierten NMDA-Rezeptorantagonisten **MK-801** (A) in den Dosierungen 0,1 und 1,0 mg/kg und **HA-966** (B) in den Dosierungen 30 und 60 mg/kg sowie des AMPA-Rezeptorantagonisten **NBQX** (C) mit 10 und 20 mg/kg auf den Schweregrad dystoner Attacken bei  $dt^{sz}$ -Hamstern (Löscher und Richter, 1993; Richter et al., 1991; 1993). Angegeben sind die (x) + S.E. der ersten, zweiten und dritten h nach Applikation von Vehikel für die Vor- und Nachkontrolle (offene Balken) bzw. Substanz (geschlossene Balken). Die Sternchen kennzeichnen eine signifikante Reduktion des Schweregrades im Vergleich zu den Kontrollversuchen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Weitere Erklärungen ergeben sich aus den Kapiteln 3.2. und 4.1. sowie der Abb. 11.



Tab. 3

Substanz	Dosierung	Tierart	Literatur
<b>NBQX</b>	10 mM/0,2 µl	Hamster	Mintz et al., 1999
<b>AP-5</b>	0,05-1 µg/0,5 µl	Ratte	Maldonado-Irizarry und Kelley, 1994
<b>HA-966</b>	10 µg und 15 µg/0,5 µl	Ratte	Morrow et al., 1999
<b>MK-801</b>	10 µg	Ratte	Kaur et al., 1997
<b>7-Nitroindazol</b>	100-200 ng/0,2 µl	Ratte	Burlet et al., 1999
<b>N-Propyl-L-Arginin</b>	6 µg/1 ml	Rind (Fetus)	El-Haddad et al., 2002

**Tab. 3:** Die Auswahl der Wirkstoffe und der Dosierungen für die striatalen Mikroinjektionen erfolgte u.a. in Anlehnung an die Literaturstellen, in denen lokale Applikationen in das Gehirn von Nagern erfolgten. Die Literaturstellen sind hier beispielhaft genannt.

Die selektive Manipulation der **Glutamat-Bindungsstelle am AMPA-Rezeptor** erfolgte durch **NBQX**. Aufgrund seiner besseren Wasserlöslichkeit wurde es in den eigenen Untersuchungen als Di-Natriumsalz verwendet. Mintz et al. (1999) konnten durch die intrazerebrale Applikation von 10 mM NBQX in 0,2 µl in Kombination mit NMDA eine signifikante Verschiebung der tageszeitabhängigen Aktivität beim Syrischen Goldhamster induzieren. **AP-5** ist ein selektiver Antagonist der **Glutamat-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors**. In Abhängigkeit von der Zielstruktur (zentrale oder mediale Region des Nucleus accumbens) trat in von Maldonado-Irizarry und Kelly (1994) untersuchten Ratten nach der Applikation von 0,05 – 1 µg AP-5/0,5 µl eine Hypo- bzw. Hyperlokomotion auf. Die selektive Manipulation der **Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors** erfolgte mit **HA-966**. Untersuchungen von Morrow et al. (1999) zeigten nach bilateraler Verabreichung von 10 µg HA-966/0,5 µl in den präfrontalen Kortex von Ratten u.a. eine Hyperlokomotion. **MK-801** ist ein selektiver **Ionenkanalblocker des NMDA-Rezeptors**. Aufgrund der besseren Wasserlöslichkeit wurde es in den eigenen Untersuchungen als Hydrogen-Maleat verwendet. In Untersuchungen von Kaur et al. (1997) konnte die striatale Applikation von 10 µg MK-801 bei Ratten einer Haloperidol-induzierten Katalepsie vorbeugen.

### 2.6.2. Hemmung der striatalen neuronalen Stickoxidsynthetase (nNOS)

Die Synthese von NO wird durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren erhöht, und als frei-diffundierbares Gas kann dieses jede beliebige Zelle in einem bestimmten Radius beeinflussen (Kiss und Vizi, 2001). Wie in den Kapiteln 2.2.2.1. und 2.5.2.1.1. erläutert, kann so die Freisetzung unterschiedlicher Transmitter moduliert werden. In Hinblick auf die mögliche Involvierung einer gestörten glutamatergen kortikostriatalen Übertragung in die Pathogenese der primären paroxysmalen Dystonie des  $dt^{sz}$ -Hamsters (s. 2.4.3.4.) ist auch eine veränderte NO-Freisetzung nicht unwahrscheinlich. Tatsächlich konnte die systemische Verabreichung unterschiedlicher Inhibitoren der Stickoxidsynthetase eine Verminderung des Schweregrades dystoner Attacken bewirken (s. 2.4.3.4) (Richter et al., 2000). Die hierbei eingesetzten Substanzen L<sup>G</sup>-Nitro-L-arginin, L<sup>G</sup>-Nitro-L-arginin-methylester und 7-Nitroindazol (7-NI) inhibieren bevorzugt die neuronale NOS (nNOS), gelten heute jedoch als relativ unspezifisch gegenüber anderen Isoformen (s. 2.6.3.1.). Durch die systemischen Applikationen sind zudem keine Rückschlüsse auf das striatale System möglich. Auch in Hinblick auf immunhistochemische Befunde der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt striatal verabreichter NOS-Inhibitoren auf den Schweregrad dystoner Attacken beim  $dt^{sz}$ -Hamster untersucht.

Die Substanzwahl erfolgte nach den gleichen Kriterien wie bereits für die Glutamaterezeptorantagonisten erläutert. 7-NI wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den systemischen Applikationen ebenfalls striatal appliziert. Die applizierten Dosierungen (s. Tab. 3) wurden ebenfalls in Anlehnung an Literaturangaben ausgewählt. Bei dem für die nNOS hochselektiven N<sup>0</sup>-Propyl-L-Arginin (NPLA) handelt es sich um eine relativ neu entwickelte Substanz, für die keine Literaturdaten zu Verhaltenseffekten nach intrazerebralen Gaben beim Nager vorlagen. Daher mußte auf eine Dosierung beim fetalen Kalb zurückgegriffen werden.

### 2.6.3. Untersuchung striataler NOS<sup>+</sup>-Interneurone

Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte eine reduzierte Dichte striataler GABAerger PV<sup>+</sup>-Interneurone bei  $dt^{sz}$ -Hamstern im Alter maximaler Dystoniausprägung im Vergleich zu Kontrolltieren gleichen Alters nachgewiesen werden (Gernert et al., 2000). Nach der Spontanremission der Dystonie waren hingegen keine signifikanten Abweichungen mehr feststellbar (Richter und Hamann, 2002). Diesen Befunden kommt vermutlich eine wichtige

pathophysiologische Rolle zu (s. 2.4.3.4.), eine verzögerte Entwicklung anderer Neuronentypen konnte hierüber jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die NOS<sup>+</sup>-Interneurone des Striatums sind funktionell eng mit dem glutamatergen System verknüpft. Sie erhalten glutamaterge Zuströme aus dem Kortex und können durch die Synthese von NO sowohl die striatale Glutamat- als auch die Dopaminfreisetzung erhöhen (s. 2.2.2.1.). Eine abweichende Dichte dieses Interneuronentyps könnte somit zu einer gestörten Neurotransmission innerhalb der Basalganglien beitragen. Daher sollte durch immunhistologische Untersuchungen der Frage nachgegangen werden, ob die Dichte der NOS<sup>+</sup>-Interneurone bei den *dt<sup>sz</sup>*-Hamstern ebenfalls ontogenetisch verändert ist.

#### 2.6.3.1. Immunhistochemische Markierung von NOS<sup>+</sup>-Interneuronen

Immunhistochemie ist eine Kombination histochemischer und immunologischer Techniken. Ihr Grundprinzip besteht in einer Antigen-Ak-Reaktion, welche durch die Markierung der Ak im Gewebe sichtbar gemacht und anschließend licht- oder elektronenmikroskopisch untersucht werden kann. Voraussetzung jeweils ist, daß die im Gewebe bzw. in der Zelle nachzuweisende Substanz den Charakter eines Antigens hat (Kischka et al., 1997). Das Prinzip der Immunhistochemie entspricht auch heute noch der von Coons und Kaplan (1950) entwickelten Methode: zuerst wird das zu untersuchende Gewebe mit einem Ak inkubiert, der gegen ein spezifisches, in der zu untersuchenden Struktur lokalisiertes, Antigen gerichtet ist. Der Antigen-Ak-Komplex kann weiter über eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Der durch ein Enzym zum Farbstoff umzusetzende Marker kann hierfür entweder *direkt* am Ak des Komplexes oder *indirekt* an einem zweiten Ak, der an den ersten Ak andockt, lokalisiert sein. Durch diese Methode können bestimmte Strukturen und Zelltypen, die charakteristische Proteine wie z.B. bestimmte Neurotransmitter oder Enzyme enthalten, auf ihre Morphologie und ihr Vorkommen untersucht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit markierten NOS-Interneurone zeichnen sich durch einen zusätzlichen Gehalt an Somatostatin, Neuropeptid Y, GABA (bzw. GAD<sub>67</sub>) sowie an NADPH-d aus (Kawaguchi et al., 1995). Die NADPH-d ist ein Enzym, das einen Kofaktor bei der NO-Synthese umsetzt und somit zur Markierung NO-haltiger Neurone geeignet ist. Dieses Enzym ist jedoch vorwiegend in den Zellkörpern zu finden und erschwert so eine genauere Charakterisierung der markierten Neurone. Die NOS ist hingegen auch in den Dendriten, Axonen und Endigungen von Nervenzellen lokalisiert (Morello et al., 1997).

Bis heute sind 3 Isoformen der NOS bekannt, deren Differenzierung durch immunhistochemische Methoden möglich ist. Die Synthese der *induzierbaren* NOS (iNOS oder NOS II) kann von einigen Zellen (Makrophagen, Hepatozyten) durch den Kontakt mit Bakterien oder verschiedenen Zytokinen aktiviert werden. Die *endotheliale* NOS (eNOS oder NOS III) ist hauptsächlich in den Gefäßendothelzellen lokalisiert und ist involviert in die Regulierung des Blutdruckes und der Gewebepfusion. Die **neuronale NOS** (nNOS bzw. NOS I) findet sich in den striatalen NOS<sup>+</sup>-Interneuronen und ist auch in anderen Gehirnregionen sowie in Zellen des peripheren Nervensystems vorzufinden (Burlet et al., 1999).

Figueredo-Cardenas et al. (1996) konnten zeigen, daß im Striatum von Ratten eine vollständige Übereinstimmung in der Markierung von Neuronen mit nNOS und NADPH-d vorhanden ist. Die immunhistochemisch nNOS<sup>+</sup>-markierten Interneurone sind aufgrund der Farbreaktion nach der 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Methode (Vaney, 1992) als schwärzliche, mittelgroße Zellen sichtbar. Sie besitzen 3 - 5 schwarz gefärbte Fortsätze mit relativ wenigen Verzweigungen und bilden keine „spines“ (s. 2.2.2.1.) (Kawaguchi et al., 1995; Nakano et al., 2000).

Die immunhistochemische Markierung mit Ak gegen die nNOS, wie in Kapitel 3.2.2. beschrieben, ist somit eine geeignete Methode, um die striatalen NOS<sup>+</sup>-Interneurone darzustellen.