Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung muskarinerger Acetylcholinrezeptoren in Dystonie-Modellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von **Jagoda Karolina Kuschka** Tierärztin aus Mikolow, Polen

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3589

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	UnivProf. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	UnivProf. Dr. Angelika Richter
Zweiter Gutachter:	UnivProf. Dr. Heidrun Fink
Dritter Gutachter:	PD Dr. Friederike Stumpff

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

animal models; movement disorders; acetylcholine; cholinergic receptors; hamsters; pilocarpine; choline acetyltransferase; mice, transgenic (MeSH); Basal Ganglia (MeSH); dystonia (MeSH); Cholinergic Antagonists (MeSH)

Tag der Promotion: 20.12.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek* Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-311-0 Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012 Dissertation, Freie Universität Berlin D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved © Mensch und Buch Verlag 2013 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de Meinen Eltern und Tobias in Dankbarkeit

INHALT

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	4
2.1. Die Basalganglien: Physiologische Funktionen und pathophysiologische	
Bedeutung für die Dystonie	4
2.1.1. Neuroanatomie der Basalganglien und ihre Bedeutung für die Motorik	4
2.1.2. Nervenzellen des Striatums	7
2.1.2.1. Striatale Projektionsneurone (MSNs)	7
2.1.2.2. Striatale Interneurone	8
2.2. Das cholinerge Neurotransmittersystem	10
2.2.1. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Acetylcholin	10
2.2.2. Das cholinerge System innerhalb der Basalganglien	13
2.2.3. Acetylcholinrezeptoren	15
2.2.3.1. Nikotinerge ACh-Rezeptoren	15
2.2.3.2. Muskarinerge ACh-Rezeptoren	16
2.2.4. Allosterische Modulation	20
2.3. Dystonien	22
2.3.1. Definition und Bedeutung	22
2.3.2. Einteilung und Genetik der Dystonie	23
2.3.2.1. Die Early-onset-Torsionsdystonie (TD)	27
2.3.3. Pathophysiologie primärer Dystonien	29
2.3.3.1. Bedeutung des TorsinA für die Early-onset-TD	31
2.3.4. Therapie der primären Dystonien	33
2.3.4.1. Medikamentöse Therapien	33
2.3.4.2. Operative Therapien	35
2.4. Tiermodelle für primäre Dystonien	36
2.4.1. Phänotypische Tiermodelle	37
2.4.1.1. Der <i>dt^{sz}</i> -Hamster	38
2.4.1.1.1. Klinisches Erscheinungsbild	39
2.4.1.1.2. Befunde zur Neuropathologie sowie zur neuronalen Aktivität bei	
der <i>dt^{sz}</i> -Mutante	40

2.4.1.1.3. Neurochemische und neuropharmakologische Befunde beim dt ^{sz} -	
Hamster	42
2.4.2. Ätiologische Tiermodelle: Das DYT1-Mausmodell	44
2.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	50
2.5.1. Zielstellung und Arbeitshypothese	50
2.5.2. Untersuchungen im <i>dt^{sz}</i> -Hamster	51
2.5.2.1. Pharmakologische Manipulationen von mAChR	51
2.5.2.2. Rezeptorautoradiographische Untersuchungen von mAChR	55
2.5.3. Untersuchung in der DYT1-Maus	55
2.5.3.1. Pharmakologische Manipulationen von mAChR	56
2.5.3.2. Immunhistochemische Untersuchung von striatalen cholinergen	
Interneuronen und Westernblot-Analysen zur Expression der	
Cholinacetyltransferase in verschiedenen Gehirnstrukturen	57
3. MATERIAL UND METHODEN	60
3.1. Material	60
3.1.1. Versuchstiere	60
3.1.1.1. <i>dt^{sz}-</i> Hamstermutante	60
3.1.1.2. DYT1-Mausmodell	60
3.1.2. Haltung und Fütterung	61
3.1.2.1. <i>dt^{sz}-</i> Hamster	61
3.1.2.2. DYT1-Maus	61
3.1.2.3. Versuchstiere post operationem	61
3.1.3. Verwendete Substanzen und Geräte	62
3.2. Methoden	64
3.2.1. <i>dt^{sz}-</i> Hamster	64
3.2.1.1. Induktion und Beurteilung der paroxysmalen Dystonie	64
3.2.1.2. Systemische pharmakologische Manipulation von mAChR	68
3.2.1.2.1. Einmalige systemische intraperitoneale Applikation	68
3.2.1.2.2. Chronischer Versuch über einen Zeitraum von 21 Tagen	68
3.2.1.3. Striatale Mikroinjektionen von Stoffen mit Wirkung auf mAChR	69
3.2.1.3.1. Stereotaktische Implantation der Führungskanülen	69
3.2.1.3.2. Mikroinjektionstechnik	71
3.2.1.3.3. Perfusion und histologische Untersuchungen zur Bestimmung der	
Lokalisation der Führungskanülen	72

3.2.1.4. Rezeptorautoradiographische Analyse der mAChR-Subtypen M1 und	
M2/M4	74
3.2.2. DYT1-Maus	75
3.2.2.1. Genotypisierung	75
3.2.2.2. Untersuchungen zur Vitalität und Motorik	76
3.2.2.3. Pharmakologische Manipulation von mAChR im DYT1-Mausmodell	81
3.2.2.3.1. Einmalige systemische intraperitoneale Applikation	82
3.2.2.3.2. Chronischer Versuch über einen Zeitraum von 21 Tagen	83
3.2.2.4. Striatale Mikroinjektionen	84
3.2.2.4.1. Stereotaktische Implantation der Führungskanülen	84
3.2.2.4.2. Mikroinjektionstechnik	84
3.2.2.4.3. Perfusion und histologische Untersuchungen zur Bestimmung der	
Lokalisation der Führungskanülen	84
3.2.2.5. Immunhistochemische Untersuchung striataler cholinerger Interneurone	
bei DYT1-Mäusen	85
3.2.2.6. Westernblot-Analyse der Cholinacetyltransferase	88
3.3. Statistische Versuchsauswertung	92
3.3.1. Untersuchungen im <i>dt^{sz}</i> -Hamster	92
3.3.1.1. Pharmakologische Manipulationen beim <i>dt^{sz}-</i> Hamster	92
3.3.1.2. Rezeptorautoradiographische Untersuchungen im dt^{sz} -Hamstermodell	93
3.3.2. Untersuchungen im DYT1-Mausmodell	93
3.3.2.1. Pharmakologische Manipulationen im DYT1-Mausmodell	93
3.3.2.2. Immunhistochemische Untersuchungen	94
	05
4.1. <i>dt^{sz}-</i> Hamster	95
4.1.1. Pharmakologische Manipulation von mAChR im <i>dt^{sz}-Hamster</i>	95
4.1.1.1. Systemisch akuter Versuch	96
4.1.1.1.1. Einmalige systemische Applikation von Tropicamid in Kombination	1
mit Trihexyphenidyl	97
4.1.1.1.2. Einmalige systemische Applikation von Pirenzepin	98
4.1.1.2. Systemisch chronischer Versuch über einen Zeitraum von 21 Tagen	100
4.1.1.2.1. Tägliche systemische Applikation von Trihexyphenidyl	100
4.1.1.2.2. Tägliche systemische Applikation von Tropicamid und	
Trihexyphenidyl	102
4.1.1.2.3. Tägliche systemische Applikation von Pirenzepin	105

4.1.1.3. Striatale Mikroinjektionen	.107
4.1.1.3.1. Striatale Mikroinjektionen von Trihexyphenidyl	.107
4.1.1.3.2. Striatale Mikroinjektionen von Tropicamid und Trihexyphenidyl	.108
4.1.1.3.3. Striatale Mikroinjektionen von VU0152100	.109
4.1.2. Rezeptorautoradiographische Untersuchungen	.112
4.2. DYT1-Maus	.115
4.2.1. Genotypisierung	.115
4.2.2. Pharmakologische Manipulation des cholinergen Systems	.115
4.2.2.1. Einmalige systemische Applikation von Pilocarpin	.116
4.2.2.2. Tägliche systemische Applikation von Pilocarpin über einen Zeitraum	
von 21 Tagen	.123
4.2.2.3. Striatale Mikroinjektionen von Pilocarpin	.129
4.2.3. Immunhistochemische Untersuchung striataler cholinerger Interneurone in	
DYT1-Mäusen	.132
4.2.4. Westernblot-Analyse der Cholinacetyltransferase	.139
5. DISKUSSION	.141
5.1. Aspekte zur Methodik	141
• 5.1.1. Untersuchungen im <i>dt^{sz}-</i> Hamster	141
5.1.1.1. Induktion und Beurteilung der Bewegungsstörungen beim <i>dt^{sz}-Hamster</i>	141
5.1.1.2. Tägliche systemische Applikation über einen Zeitraum von 21 Tagen	142
5.1.1.3. Striatale Mikroinjektionen beim <i>dt^{sz}-</i> Hamster	.142
5.1.1.4. Rezentorautoradiographische Untersuchungen	
	.144
5.1.2. Untersuchungen in der DYT1-Maus	.144 .145
5.1.2. Untersuchungen in der DYT1-Maus	144 .145 .145
 5.1.2. Untersuchungen in der DYT1-Maus	144 145 145
 5.1.2. Untersuchungen in der DYT1-Maus 5.1.2.1. Genotypisierung 5.1.2.2. Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der Vitalität und Motorik von DYT1-Mäusen 	144 145 145 146
 5.1.2. Untersuchungen in der DYT1-Maus 5.1.2.1. Genotypisierung 5.1.2.2. Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der Vitalität und Motorik von DYT1-Mäusen 5.1.2.3. Pharmakologische Manipulationen 	144 145 145 146 149
 5.1.1.4. Rezeptoradiographische Ontersuchungen	144 145 145 146 149
 5.1.1.4. Rezeptoradiographische Ontersuchungen	.144 .145 .145 .146 .149 .153
 5.1.1.4. Rezeptoradiographische Ontersüchungen	144 145 145 146 149 153 154
 5.1.1.4. Rezeptorationatiographische Onterstehnungen	144 145 145 146 149 153 154 156
 5.1.1.4. Rezeptorationadiographische Ontersuchungen	144 145 145 146 149 153 154 156
 5.1.1.4. Rezeptorationatiographische Ontersuchungen	144 145 145 145 146 149 153 154 156 156
 5.1.1.4. Rezeptorautorautographische Ontersuchungen	144 145 145 145 146 149 153 154 156 156

5.2.1.1.2. Systemische Applikationen von mAChR-Antagonisten über einen	
Zeitraum von 21 Tagen	.158
5.2.1.1.3. Striatale Mikroinjektionen von mAChR-Antagonisten	.160
5.2.1.1.4. Striatale Mikroinjektionen des positiven allosterischen Modulators	
VU0152100	.162
5.2.1.1.5. Akute und chronische systemische Applikationen von Pirenzepin	.163
5.2.1.2. Rezeptorautoradiographische Untersuchungen	.164
5.2.2. DYT1-Maus	.166
5.2.2.1. Pharmakologische Manipulation des cholinergen Systems	.166
5.2.2.1.1. Einmalige systemische Applikation von Pilocarpin	.166
5.2.2.1.2. Tägliche systemische Applikation von Pilocarpin über einen	
Zeitraum von 21 Tagen	.168
5.2.2.1.3. Striatale Mikroinjektionen von Pilocarpin	.169
5.2.2.2. Immunhistochemische Untersuchungen striataler cholinerger	
Interneurone in DYT1-Mäusen	.172
5.2.2.3. Westernblot-Analyse der Cholinacetyltransferase	.174
5.3. Schlussbetrachtungen	.175
6. ZUSAMMENFASSUNG	.178
7. SUMMARY	.180
8. LITERATURVERZEICHNIS	.182
9. TABELLARISCHER ANHANG	.221
PUBLIKATIONSLISTE	.267
DANKSAGUNG	.268
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	.270

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bezeichnung
Abb.	Abbildung
AcCoA	Acetyl-Coenzym A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AFDX	M2/M4 Antagonist
	N-[2-[2-[(Dipropylamino)methyl]-1-piperidinyl]ethyl]-5,6-
	dihydro-6-oxo-11H-pyrido[2,3-b][1,4]benzodiazepin-11-
	carboxamid
Ak	Antikörper
AMPA	a-Amino-3-hydroxy-5-methyl-5-isoxazolepropionic acid
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
bzgl.	bezüglich
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
Ca ²⁺	Calciumionen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChAT	Cholinacetyltransferase
СНТ	Cholintransporter
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxylende
d	Тад
DA	Dopamin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DAT	Dopamintransporter
DBS	Deep brain stimulation
dest.	destillata
d.h.	das heißt
dl	dorsolateral
dm	dorsomedial
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylessigsäure
DRD	Dopa-responsive Dystonie
D-Rezeptor	Dopaminrezeptor
dt	Gensymbol für dyston
ECL	"enhanced chemiluminescence"
EEG	Elektroenzephalografie
EMG	Elektromyografie
EPN	entopeduncularer Nucleus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazelluläre signalabhängige Kinase
et al.	und andere
Fa.	Firma
FS	"fast spiking"
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GP	Globus pallidus
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
G-Proteine	Guanin-bindende Proteine
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
	(engl.: G protein-coupled receptor)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAGH	Hydroxyacylglutathion Hydrolase
Hem.	Hemisphäre
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
hMT	humanes (menschliches) mutiertes Gen
HVA	Homovanillinsäure
hWT	humanes (menschliches) Wildtyp-Gen
i.d.R.	in der Regel
inject.	injectabilia
IP ₃	Inositoltriphosphat
i.p.	intraperitoneal
K ⁺	Kaliumionen
Kap.	Kapitel

II

kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
I	Liter
Lsg.	Lösung
LTD	Langzeit-Depression
	(engl.: long-term depression)
LTP	Langzeit-Potenzierung
	(engl.: long-term potentiation)
LTS	niederschwellige Calcium-Aktionspotenziale
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LT	Lebenstag
Μ	molar
mAChR	muskarinerger Acetylcholinrezeptor
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MR-1	Myofibrilloregulator-1-Gen
MRI	Magnetresonanztomographie
	(engl.: Magnetic Resonance Imaging)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ms	Millisekunden
MSNs	striatale Projektionsneurone
	(engl.: medium spiny neurons)
M.W.	Mittelwert
hð	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μm	Mikrometer
n	Anzahl von Tieren in einer Versuchsgruppe
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NADPH-d	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-diaphorase
NAM	negativer allosterischer Modulator
Ncl.	Nucleus
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

NOS	Stickoxidsynthetase
	(engl.: nitric oxide synthase)
PAM	positiver allosterischer Modulator
PAG	periaquäduktale Grausubstanz
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
	(engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	paroxysmale dystone Choreoathetose
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKD	paroxysmale kinesiogene Dyskinesien
PLC	Phospholipase C
pmol	Pikomol
PNKD	paroxysmale non-kinesiogene Dyskinesien
PPN	Pendunculopontiner Nucleus
PV ⁺	Parvalbumin-reaktiv
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
	(engl.: rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
s bzw. sec	Sekunde
S.	siehe
S.D.	Standardabweichung
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese
	(engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel
	electrophoresis)
S.E.	Standardfehler
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulate
S.O.	siehe oben
sog.	sogenannte
STN	Subthalamischer Nucleus
s.u.	siehe unten
SZ	Gensymbol für seizures
ТА	TorsinA

IV

Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer
TAN	cholinerge Interneurone
	(engl.: tonically active neurons)
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS gepufferte Saline
TBST	TBS-Tween
TD	Torsionsdystonie
TH⁺	Tyrosinhydroxylase
THA	Thalamus
ТМ	transmembranäre Domäne
u.a.	unter anderem
VAChT	in die Vesikelmembran integrierter ACh-Transporter
vl	ventrolateral
vm	ventromedial
VMAT2	Vesikulärer Monoamin Transporter vom Typ 2
VU0152100	3-amino-N-(4-methoxybenzyl)-4,6-dimethylthieno[2,3-
	b]pyridincarboxamid
WT	Wildtyp
XEM	Xylolersatzmedium
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil

1. EINLEITUNG

Dystonien sind definiert als ein neurologisches Syndrom, in dem unwillkürlich anhaltende Muskelkontraktionen zu schraubenartigen Bewegungen und/oder Fehlhaltungen führen (Fahn *et al.*, 1987) und werden heute zu den häufigsten Bewegungsstörungen des Menschen gezählt (Defazio, 2010). Die Bedeutung bei unseren Haustieren ist hingegen bislang wenig untersucht, allerdings werden Fälle mit ähnlicher Symptomatik insbesondere bei Hunden beschrieben (Clemmons *et al.*, 1980; Rusbridge, 2005).

Bei 2/3 aller Dystonien handelt es sich um primäre Formen, bei denen keine pathomorphologischen Veränderungen im Zentralnervensystem mittels Standardtechniken nachweisbar sind. Bei sekundären Dystonieformen hingegen liegen häufig Veränderungen in den Basalganglien vor. Diese Gehirnstrukturen sind für die Kontrolle der Motorik von enormer Bedeutung. Daher werden auch für primäre Dystonieformen biochemische Dysfunktionen innerhalb der Basalganglien vermutet. So wird angenommen, dass den primären Dystonien Imbalancen verschiedener Neurotransmitter zugrunde liegen. Hierüber kommt es vermutlich zu Störungen des empfindlichen, fein abgestimmten und komplexen Netzwerkes aus Nervenzellen im Gehirn und damit zu Störungen der Verschaltung verschiedener Gehirnareale (Mink, 2003). Da die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Erkrankung bisher noch weitestgehend ungeklärt sind, handelt es sich hierbei lediglich um Hypothesen. Erschwert wird die Suche nach den zugrundeliegenden Mechanismen dadurch, dass die Pathophysiologie für verschiedene Formen der Dystonie vermutlich heterogen ist.

Durch das Fehlen eines einheitlichen pathophysiologischen Grundkonzeptes ist eine gezielte Therapie bislang nicht möglich. Die daher zurzeit rein empirisch durchgeführten Therapiemaßnahmen sind oft unwirksam oder unbefriedigend, so dass die Erkrankung häufig zu schweren Behinderungen führt. Einige Anticholinergika, also Substanzen, die die Wirkung des endogenen Botenstoffes Acetylcholin hemmen, bewirken zwar eine Besserung der Dystonie bei vielen Patienten, aber diese Medikamente müssen häufig über einen langen Zeitraum in hohen Dosierungen eingenommen werden, bevor sie ihre Wirkung entfalten und sind zudem mit einer Vielzahl schwerwiegender Nebenwirkungen behaftet (Jankovic, 2009). Es wird vermutet, dass die Entstehung von Dystonien und die antidystone Wirkung von Anticholinergika bei Patienten im Zusammenhang mit muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) vom Typ 1 und 4 steht (Pisani *et al.*, 2007). Die Unklarheit über die zugrundeliegenden Fehlfunktionen des cholinergen Neurotransmittersystems bei der Entstehung von Dystonien verhindert gegenwärtig die Entwicklung von Anticholinergika mit einem effektiveren Wirkungs- und einem abgeschwächten Nebenwirkungsprofil. Ziel dieses Promotionsvorhabens war es daher, mittels pharmakologischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Studien in zwei anerkannten Tiermodellen für Dystonien die pathophysiologische Bedeutung des cholinergen Neurotransmittersystems genauer zu untersuchen und damit einen Beitrag zur Verbesserung der Therapieansätze zu leisten.

Als einziges gut etabliertes und charakterisiertes phänotypisches Tiermodell für eine paroxysmale Dystonie gilt der dt^{sz} -Hamster, bei dem dystone Episoden durch Stress, Alkohol oder Koffein auslösbar sind (Richter, 2005). Es wird angenommen, dass eine reduzierte Dichte striataler Interneurone, die γ -Aminobuttersäure (GABA) enthalten, den Primärdefekt in der Pathogenese der Dystonie beim dt^{sz} -Hamster darstellen könnte (Gernert *et al.*, 2000; Hamann *et al.*, 2005 und 2007; Sander *et al.*, 2006). Hierüber kann jedoch nicht der paroxysmale Charakter der Dystonie erklärt werden. Zwar wiesen vorangehende Untersuchungen auf ein unverändertes cholinerges System im dt^{sz} -Hamster hin (Hamann *et al.*, 2006), diese Befunde schließen aber eine temporäre cholinerge Überaktivität als Folge einer verminderten GABAergen Hemmung innerhalb des Striatums nicht aus. Der möglichen pathophysiologischen Bedeutung einer cholinergen Überaktivität im Dystoniegeschehen sollte daher durch die folgenden Untersuchungen in dt^{sz} -Hamstern weiter nachgegangen werden.

Vorangegangene einmalige Applikationen des mAChR1-Antagonisten Trihexyphenidyl und des mAChR4-Antagonisten Tropicamid zeigten nur moderate antidystone Effekte bei *dt*^{sz}-Hamstern (Löscher und Fredow, 1992, Smiljanic, 2010). Daher sollte nun untersucht werden, ob durch Kombination von mAChR1- und mAChR4-Antagonisten eine stärkere Wirksamkeit bei besserer Verträglichkeit erzielt werden kann. Da Anticholinergika bei Dystoniepatienten erst nach wochenlanger Einnahme ihre volle Wirkung entfalten, sollte zusätzlich die Wirkung einer chronischen Behandlung untersucht werden. Durch die systemische Gabe des mAChR1-Antagonisten Pirenzepin, der nicht die Blut-Hirn-Schranke passiert, sollte festgestellt werden, ob antidystone Wirkungen durch periphere Effekte, z.B. über präsynaptische mAChR1 an Motoneuronen, erzielt werden können. Um die Rolle striataler Störungen des cholinergen Systems zu untersuchen, wurden lokale striatale Mikroinjektionen mit Trihexyphenidyl und Tropicamid durchgeführt. Weiterhin wurde der spezifische mAChR4-Modulator VU0152100, dessen Verwendung laut Conn *et al.* (2009) ein neuer therapeutischer Ansatz zur spezifischen Manipulation von mAChR4 darstellen könnte, striatal bei *dt*^{sz}-Hamstern appliziert.

2

Zur Erforschung der so genannten "Early-onset-Torsionsdystonie" haben Sharma *et al.* (2005) zur Etablierung eines geeigneten Mausmodells das für diese Dystonieform bekannte humane Defektgen in das Erbgut von Mäusen eingebracht. Zwar zeigen diese transgenen Mäuse per se keine dystonen Bewegungsstörungen, könnten aber hilfreich bei der Aufklärung der Mechanismen sein, die in nur 30-40% der Genträger die Erkrankung zur Ausprägung bringen. Vorangehende *in-vitro* Untersuchungen in diesen Mäusen deuteten auf Störungen des cholinergen Neurotransmittersystems hin (Pisani *et al.*, 2006; Martella *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der funktionellen Relevanz dieser *in-vitro* Befunde mittels pharmakologischer *in-vivo* Untersuchungen nachgegangen werden. Hierzu wurden verschiedene verhaltensanalytische Untersuchungen nach akuter und chronischer systemischer sowie nach lokaler striataler Applikation des Cholinomimetikums Pilocarpin durchgeführt. Augenmerk wurde hierbei besonders auf die mögliche Provokation eines dystonen Phänotyps gelegt. Neuropathologische Untersuchungen, die immunhistochemische Untersuchungen striataler cholinerger Interneurone sowie Westernblot-Analysen des Proteins Cholinacetyltransferase in verschiedenen Gehirnregionen einschlossen, sollen zeigen, ob das DYT1-Gen zu bisher nicht untersuchten Veränderungen im cholinergen System bei DYT1-Mäusen führen könnte.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Die Basalganglien: Physiologische Funktionen und pathophysiologische Bedeutung für die Dystonie

2.1.1. Neuroanatomie der Basalganglien und ihre Bedeutung für die Motorik

Die Basalganglien sind ein integraler Bestandteil des komplexen extrapyramidalen motorischen Systems, das in Interaktion mit dem pyramidalen System für die Kontrolle der Motorik zuständig ist. Sie setzen sich aus einer Gruppe miteinander verschalteter subkortikal gelegener Kerne zusammen, die neben dem motorischen Verhalten auch in emotionale, motivierende, assoziative und kognitive Funktionen involviert sind (Nakano, 2000; Bolam et al., 2000). Ihnen wird eine wichtige Rolle für die Integration kortikaler Informationen, deren Verarbeitung und Umsetzung in ein kontext-abhängiges Verhalten zugesprochen (Nauta und Domesick, 1984; Graybiel et al., 1994). Zu den Basalganglien zählen das Neostriatum, der Globus pallidus (GP), der Nucleus (Ncl.) Subthalamicus (STN) sowie die Substantia nigra (SN). Letztere wird wiederum in die dorsale pars compacta (SNc), in welcher die dopaminergen nigrostriatalen Neurone lokalisiert sind, und die weiter ventral gelegene pars reticulata (SNr) unterteilt. Während das Neostriatum beim Nager aus einem einheitlichen Kern besteht, wird es bei höheren Vertebraten durch die Capsula interna in Ncl. Caudatus und Putamen unterteilt. Der GP des Primaten setzt sich ebenfalls aus zwei Segmenten zusammen, wobei der interne Globus pallidus (GPi) dem entopenduncularen Ncl. (EPN) und der externe Globus pallidus (GPe) dem GP des Nagers entspricht (Smith et al., 1998).

Diese Strukturen werden dem dorsalen Regelkreis der Basalganglien zugeordnet, der hauptsächlich an motorischen und assoziativen Funktionen beteiligt ist. Der ventrale Regelkreis, bestehend aus dem Ncl. accumbens, dem ventralen Pallidum und dem ventralen tegmentalen Areal, ist hingegen vielmehr in limbische Funktionen involviert (Bolam *et al.*, 2000).

Das Striatum bildet die Eingangsstruktur der Basalganglien und dient vermutlich als Steuerzentrale für die Planung und Ausführung motorischer Aktivitäten (Graybiel *et al.*, 1994; Kreitzer und Malenka, 2008; Jin und Costa, 2010). Wie in Abb. 1 schematisch dargestellt, erhält das Striatum seine Informationen hauptsächlich aus verschiedenen Arealen des Kortex in Form von exzitatorischen glutamatergen und aspartatergen Zuströmen sowie dopaminergen Zuströmen aus der SNc. Des Weiteren erhält es neben glutamatergen Signalströmen vom Thalamus und der Amygdala serotonerge und noradrenerge Projektionen von den Raphe-Kernen und dem Locus coerulus (Pollack, 2001) sowie cholinerge Zuströme aus dem pedunculopontinen Ncl. (PPN) (Peterson *et al.*, 2010). Diese afferenten Signale werden im Striatum über sog. striatale Interneurone verschaltet und über inhibierende GABAerge Projektionsneurone (s. Punkt 2.1.2.1.), zum GPi und der SNr, welche die Ausgangsstruktur der Basalganglien bilden, weitergeleitet. Bei der Verschaltung zwischen Striatum und diesen Ausgangsstrukturen werden zwei striatale Signalwege unterschieden: der direkte striatonigrale Weg und der indirekte striatopallidale Weg. Striatale Neurone, die über den direkten Weg projizieren, exprimieren Dopamin (DA) D₁-Rezeptoren sowie Substanz P und Dynorphin und senden monosynaptische Axone zum GPi und zur SNr aus. Der indirekte Weg hingegen wird von Enkephalin enthaltenden striatalen Neuronen requiert, die D₂-Rezeptoren exprimieren und eine polysynaptische Verschaltung aufweisen. Sie projizieren inhibitorisch zum GPe, der seinerseits über GABAerge Neurone zum STN projiziert, von wo aus wiederum glutamaterge Projektionen zum GPi und STN entsendet werden (Herrero et al., 2002). Obwohl die Verschaltung der beiden Signalwege sehr komplex ist, wird auf Grundlage eines vereinfachten Models der Basalganglienschleife postuliert, dass der direkte Weg kortikal initiierte Bewegungen durch eine Disinhibition des Thalamus verstärkt, während der indirekte Weg antagonistische und ungewollte Bewegungen inhibiert (Vitek, 2002). Unter physiologischen Bedingungen geht man davon aus, dass sich die beiden beschriebenen Projektionsbahnen im Gleichgewicht befinden. Basierend auf dieser Hypothese würden Störungen innerhalb des Gleichgewichts abhängig vom betroffenen Neurotransmittersystem in einer Hypokinesie, d.h. in einer Bewegungsverminderung, oder in einer Hyperkinesie, d.h. in überschießenden Bewegungen resultieren (Vitek, 2002).



Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung wichtiger Verbindungen innerhalb der Basalganglien unter physiologischen Bedingungen. Dargestellt ist die sog. kortiko-striato-thalamokortikale Feedback-Schleife. Das Striatum als Eingangsstruktur der Basalganglien erhält erregende Zuflüsse vom Kortex, die über inhibierende Projektionsneurone entweder auf direktem oder indirektem Weg (GPe und STN) zu den Basalganglienausgangsstrukturen GPi [EPN] und SNr weitergeleitet werden. Von dort projizieren inhibierende Neurone zum Thalamus, der wiederum den Kortex durch exzitatorische Projektionen erregt. Dopaminerge Neurone der SNc greifen regulierend in den direkten und indirekten Weg ein, indem der direkte Weg über D₁-Rezeptoren erregt oder der indirekte Weg über D₂-Rezeptoren gehemmt wird. Schwarze Linien kennzeichnen inhibitorische GABAerge, rote Linien exzitatorische glutamaterge bzw. aspartaterge und blaue Linien dopaminerge Projektionen. GPe: Globus pallidus externus; GPi: Globus pallidus internus; SNc: Substantia nigra pars compacta; SNr: Substantia nigra pars reticulata; STN: Ncl. Subthalamicus; THA: Thalamus; Hst: Hirnstamm; RM: Rückenmark (modifiziert nach Vitek und Giroux, 2000).

Bei Hypokinesien wie beispielsweise der Parkinson-Krankheit, wird angenommen, dass ein Dopaminmangel infolge der Degeneration dopaminerger Neurone in der SNc über den indirekten und den direkten Weg zu einer erhöhten Aktivität der Basalganglienausgangsstruktur (GPi) führt, die in einer verstärkten Inhibition des Thalamus und somit in der Unterdrückung der vom motorischen Kortex initiierten Bewegung resultiert (Abb. 2A; Vitek, 2002).

Bei Dystonien und Hyperkinesien wie Chorea Huntington hingegen wird eine verminderte Aktivität der Neurone im GPi vermutet, woraus eine Enthemmung des Thalamus und folglich eine erhöhte thalamo-kortikale Erregung resultiert (Abb. 2B). Diese Hypothese wird durch elektrophysiologische Untersuchungen, die bei Dystoniepatienten im Rahmen der tiefen Hirnstimulation durchgeführt wurden, unterstützt (Vitek, 2002).



Abb. 2: Schematische Darstellung der Hypothese zur Entstehung von hypokinetischen (A) und hyperkinetischen (B) Bewegungsstörungen. Bei der Parkinson'schen Krankheit (A) führt ein Verlust der dopaminergen Modulation durch die SNc sowohl über den direkten als auch indirekten Weg zu einer Überinhibition des Thalamus, die wiederum in einer verminderten Erregung des Kortex resultiert. Im Falle der Dystonie (B) wird eine verminderte Aktivität der Neurone im GPi vermutet, die zur Enthemmung des Thalamus und somit zu einer erhöhten thalamo-kortikalen Erregung führt. Im Vergleich zum Zustand unter physiologischen Bedingungen (siehe Abb. 1) zeigen dickere Linien eine erhöhte, und dünnere Linien eine erniedrigte neuronale Aktivität an. Weitere Erläuterungen s. Abb. 1.

2.1.2. Nervenzellen des Striatums

Wie bereits beschrieben, ist das Striatum (Caudate-Putamen) Zielstruktur zahlreicher afferenter Eingänge aus verschiedenen Regionen und stellt innerhalb der Basalganglien wahrscheinlich die Hauptregion für die Informationsverarbeitung dar (Tepper und Bolam, 2004). In anatomischer Hinsicht werden die striatalen Neurone in zwei Hauptgruppen unterteilt:

a) Projektionsneurone (medium spiny neurons, kurz MSNs) mit sogenannten "spines" (dornenhafte Ausstülpungen der Dendriten) und b) Interneurone ohne "spines" (aspiny interneurons) unterteilt (Kreitzer, 2009).

2.1.2.1. Striatale Projektionsneurone (MSNs)

Striatale Projektionsneurone repräsentieren mit etwa 90-95 % die Mehrheit der striatalen Neurone (Kreitzer, 2009). Sie sind GABAerg und können, basierend auf ihren axonalen Projektionen zur SNr/GPi oder zum GPe, nochmals in striatonigrale (direkter Weg) und striatopallidale (indirekter Weg) Subtypen unterschieden werden (Smith *et al.*, 1998). Die MSNs erhalten glutamaterge Signale vom Kortex und Thalamus, die vorzugsweise auf den spines der Dendriten synaptische Verbindungen eingehen (Kemp und Powell, 1971). Zusätzlich sind sie das Hauptziel von Axonen dopaminerger Neurone aus dem Mittelhirn (Smith *et al.*, 1994). Histochemische Untersuchungen ergaben, dass striatonigrale

Projektionsneurone einen hohen Gehalt an dopaminergen D_{1^-} und muskarinergen M4-Rezeptoren sowie Dynorphin und Substanz P exprimieren (Gerfen, 1992; Ince *et al.*, 1997). Striatopallidale Projektionsneurone hingegen sind durch eine hohe Expression von Dopamin D_2 -Rezeptoren sowie durch ihre Immunreaktivität gegenüber Enkephalin gekennzeichnet (Schiffman *et al.*, 1991; Gerfen, 1992). Elektrophysiologisch zeigen die beiden Projektionsneuronen-Subtypen ähnliche Eigenschaften, wobei die striatonigralen Projektionsneurone eine erhöhte Erregbarkeit zeigen und jeder Subtyp auf unterschiedliche Weise von Dopamin und ACh moduliert wird (Shen *et al.*, 2007; Surmeier *et al.*, 2007).

2.1.2.2. Striatale Interneurone

Striatale Interneurone stellen insgesamt mit ca. 5% im Nager (Rymar et al., 2004) und möglicherweise bis zu 23% bei Primaten (Graveland et al., 1985b) nur einen geringen Anteil der Neurone im Striatum dar und sind im Gegensatz zu den Projektionsneuronen "dornenlos". Sie sind phänotypisch vielfältig und weisen hochspezifische Eigenschafen auf, die ihnen die Anpassung und Umwandlung der in den MSNs eingehenden kortikalen Informationen ermöglicht (Tepper und Bolam, 2004). Morphologisch werden striatale Interneurone in zwei Hauptklassen unterteilt: GABAerge und cholinerge Interneurone. Basierend auf deren neurochemischen Eigenschaften können außerdem drei verschiedene Subtypen GABAerger Interneurone unterschieden werden: zwei dieser Subtypen exprimieren jeweils das Ca²⁺-bindende Protein Parvalbumin (PV⁺) oder Calretinin, die dritte Gruppe co-exprimiert die Peptide Somatostatin oder Neuropeptid Y sowie die Enzyme NOS (engl. nitric oxide synthase = Stickstoffmonoxid-Synthase) bzw. Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphatdiaphorase (NADPH-d) (Kawaguchi et al., 1995). Neuere Studien ergaben außerdem eine zusätzliche Gruppe GABAerger Interneurone, die das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH⁺) exprimieren und auf elektrophysiologischer Basis in weitere vier verschiedene Typen eingeteilt werden können (hier nicht weiter erläutert, zur Übersicht s. Tepper et al., 2010 oder Ibáñez-Sandoval et al., 2010).

Die **GABAergen PV⁺-Interneurone** exprimieren das Ca²⁺-bindende Protein Parvalbumin und werden aufgrund ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften auch als "fast spiking" (FS) Interneurone bezeichnet (Kawaguchi, 1993). PV⁺-reaktive Interneurone empfangen eine beachtliche Zahl an exzitatorischen glutamatergen Afferenzen aus Kortex und Thalamus, von striatalen GABAergen Projektionsneuronen und anderen PV⁺-Neuronen (Bolam *et al.*, 2000; Tepper und Plenz, 2005) sowie dopaminerge Afferenzen (von der SNc) und cholinerge Eingänge von Interneuronen (Pollack, 2001; Chang und Kita, 1992). Ihre Axonterminalen erstrecken sich entlang eines mediolateralen Gradienten, so dass ihre wesentliche Funktion im lateralen Striatum vermutet wird (Bolam und Bennett, 1995). Über zahlreiche

perisomatische Synapsen sind GABAerge PV⁺-Interneurone in der Lage, wichtige Neurone, insbesondere GABAerge Projektionsneurone, monosynaptisch zu hemmen (Koos und Tepper, 1999; Koos *et al.*, 2004) und tragen somit wesentlich zur Regulierung der striatalen Signalübertragung bei.

Die **GABAergen Calretinin-reaktiven Interneurone** exprimieren das Ca²⁺-bindende Protein Calretinin. Ähnlich den GABAergen PV⁺-Interneuronen üben sie eine starke monosynaptische Inhibition auf die GABAergen Projektionsneurone aus (Tepper und Bolam, 2004).

Die dritte Gruppe GABAerger Interneurone ist elektrophysiologisch durch eine niedrige Reizschwelle und das Feuern mit unterschwelligen Aktionspotentialen charakterisiert, weshalb sie auch als **LTS-Interneurone** (engl.: low threshold calcium spikes) bezeichnet werden. Sie sind durch die Co-Expression von Somatostatin, NADPH-d, dem Neuropeptid Y oder NOS gekennzeichnet (Vincent *et al.*, 1983; Smith und Parent, 1986). Sie erhalten sowohl cholinerge als auch dopaminerge Zuströme und bilden Synapsen mit GABAergen Projektionsneuronen (Bolam und Bennet, 1995; Sidibe und Smith, 1999).

Die cholinergen Interneurone sind mit einer durchschnittlichen Zellgröße von bis zu 40 µm die größten Neurone des Neostriatums und werden diesbezüglich auch "large aspiny neurons" genannt (Nakano et al., 2000). Sie vertreten nur etwa 1% der Gesamtpopulation striataler Neurone bei der Ratte (Rymar et al., 2004), wohingegen ihre Anzahl bei Menschen und anderen Primaten höher liegt (Graveland et al., 1985b). Ihre polygonalen spindelfömigen Zellkörper senden drei bis sechs dicke, glatte oder spärlich bedornte Hauptdendriten aus, die wenig verzweigt sind und in ihrem Durchmesser bis zu 1 mm erreichen (Wilson et al., 1990). Ihre dichten, weit verbreiteten Axonkollateralen sind weitestgehend auf die striatale Matrix beschränkt, von wo aus sie in erster Linie striatale Projektionsneurone (Bolam und Bennett, 1995; Gerfen und Wilson, 1996), aber auch GABAerge Interneurone aktivieren (Koos und Tepper, 2002; Chang und Kita, 1992). Ein Großteil ihrer Varikositäten bildet keine typischen Synapsen aus, was auf einen zusätzlichen volumetrischen Modus der Neurotransmission, der durch extrasynaptische Diffusion von Signalmolekülen gekennzeichnet ist, hindeutet (Descarries et al., 1997). Cholinerge Interneurone sind tonisch aktiv und weisen eine autonome Schrittmacheraktivität auf (Bennett und Wilson, 1999). Diese tonische Aktivität wird extrinsisch moduliert beispielsweise durch exzitatorische (glutamaterge) Afferenzen vom Kortex und Thalamus, inhibitorische GABAerge Eingänge von striatalen Projektionsneuronen sowie dopaminergen Zuströmen aus der SNc (Lapper und Bolam, 1992; Reynolds und Wickens, 2004; Bolam und Bennett, 1995). Die Funktion cholinerger Interneuronen besteht in der Modulation unter- bzw. überschwelliger Reaktionen der striatalen Projektionsneurone auf die exzitatorischen Eingänge kortikaler und/oder thalamischer Areale (Tepper und Bolam, 2004). Cholinerge Interneurone können mittels des Markers Cholinacetyltransferase immunhistologisch dargestellt werden (Kawaguchi *et al.*, 1995). Die physiologische und möglicherweise pathophysiologische Bedeutung des cholinergen Neurotransmittersystems wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

2.2. Das cholinerge Neurotransmittersystem

2.2.1. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Acetylcholin

Acetylcholin (ACh) gilt als erster identifizierter Botenstoff in der Geschichte der Neurologie (Dale, 1914; Loewi, 1921: "Vagusstoff"). Neben seiner weiten Verbreitung und wichtigen Rolle im peripheren (vegetativen) Nervensystem, so u.a. in der Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte, stellt ACh auch für das ZNS einen wichtigen Transmitter dar. Obwohl cholinerge Neurone weniger als 1% aller Neurone des ZNS darstellen, sind sie in eine Vielzahl funktioneller und verhaltensgesteuerter Prozesse involviert (Woolf und Butcher, 2011). So ist das cholinerge System für die Steuerung wichtiger kognitiver Prozesse, Erregung und Schlaf verantwortlich (Wevers, 2010). Eine weitere bedeutende Rolle spielt das cholinerge System innerhalb der Basalganglien (s. Punkt 2.1.1.) für den Ablauf und die Kontrolle der Motorik. Hinweise auf cholinerge Funktionsstörungen bestehen für zahlreiche neurologische und psychische Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Huntington'sche Krankheit, Dystonien, Tourette-Syndrom, Epilepsie und Schizophrenie (Graveland *et al.*, 1985a; Obeso *et al.*, 2000; Lucas-Meunier *et al.*, 2003; Wichmann und DeLong, 2003; Augood *et al.*, 2004; Albin und Mink, 2006).

ACh wird mit Hilfe des Enzyms Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Acetyl-Coenzym A (kurz: AcCoA) und Cholin zusammengesetzt (s. Abb. 3). Über einen in die Vesikelmembran integrierten ACh-Transporter (VAChT) wird es aus dem Zytosol in neurosekretorische Vesikel aufgenommen und dort gespeichert. Beim Eintreffen eines Aktionspotentials erfolgt die Ca²⁺-abhängige ACh-Freisetzung in den synaptischen Spalt, von wo aus die ACh-Moleküle zur postsynaptischen Membran diffundieren und dort in Wechselwirkung mit ACh-Rezeptoren treten. Die Aktivität des ACh im synaptischen Spalt wird durch das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) limitiert, indem das ACh in Cholin und Acetat gespalten und somit unwirksam gemacht wird. Das Cholin wird anschließend durch hochaffine, Na⁺- abhängige Cholintransporter (CHT) wieder in das Neuron aufgenommen und recycelt. (Mullen *et al.*, 2007). ACh bindet im ZNS an zwei in Struktur und Funktion unterschiedliche Rezeptorep und zwar an ionotrope nikotinerge ACh-Rezeptoren und an metabotrope muskarinerge ACh-Rezeptoren (s. Kap. 2.2.3.).



Abb. 3: Schematische Darstellung einer cholinergen Synapse mit Biosynthese, Freisetzung und Abbau von ACh. Die Pfeile markieren die einzelnen Stoffbewegungen und Stoffumwandlungen. Aktivierende bzw. inhibierende Einflüsse sind durch ein + bzw. – gekennzeichnet. Die postsynaptische Membran weist nikotinerge als auch G-Protein gekoppelte muskarinerge Rezeptoren auf. ACh kann über präsynaptische Autorezeptoren (A) seine eigene Freisetzung modulieren. Weitere Erläuterungen siehe Text. (Abb. aus: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Cholinerge Synapse; Herausg.: Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke; 10. Auflage, Urban & Fischer, 2009).

Wie in Abb. 4 dargestellt, umfasst das cholinerge System des Säugetier-Gehirns mehrere größere Zellgruppen und cholinerge Nervenfaserbündel, die sich wie folgt unterteilen lassen: (1) eine große Anzahl cholinerger Motorneurone im Rückenmark und Myelencephalon, (2) eine Anhäufung cholinerger Projektionsneurone in der mesopontinen Region, (3) eine kleine Gruppe cholinerger Neurone in der medialen Habenula, (4) zahlreiche cholinerge Projektionsneurone im basalen Vorderhirn sowie (5) einigen Ansammlungen cholinerger Interneurone im Striatum, dem olfaktorischen Tuberkel und dem Calleja-Insel-Komplex. Darüber hinaus gibt es cholinerge Neurone, die mit monoaminen Neuronen co-existieren, wie beispielsweise mit serotonergen Neuronen in den Raphekernen oder mit noradrenergen Neuronen im Locus coeruleus (Armstrong *et al.*, 1983; Butcher und Woolf, 2004; Houser *et al.*, 1983; Kimura *et al.*, 1981; Semba und Fibiger, 1989; Woolf, 1991).



Abb.4: Schematische Darstellung cholinerger Signalwege im zentralen Nervensystem (weitere Erläuterungen s. Text; modifiziert nach Woolf, 1991; Butcher und Woolf, 2004).

Diese cholinergen Neurone formen ein weitläufiges zusammenhängendes Netzwerk, das sich von den kranialen Nervenkernen des Hirnstamms ausgehend über das medulläre und pontomesencephale Tegmentum und weiter nach rostral bis in das Diencephalon und Telencephalon erstreckt (Woolf, 1991). Hierbei werden hauptsächlich drei cholinerge Teilsysteme unterschieden, von denen zwei (in Abb. 4 in dunkelgrau und hellgrau dargestellt) über eine weitläufige und diffuse Innervation in weite Teile des Gehirns projizieren. Die cholinergen Neurone dieser beiden Projektionssysteme entspringen entweder aus verschiedenen Kernen des basalen Vorderhirns (bsp. dem Ncl. Meynert) und innervieren größtenteils Bereiche des Kortex (cingulärer Kortex und Neokortex) sowie den Hippocampus oder sie entstammen Kernen des Hirnstamms (wie bsp. dem pedunculopontinen oder laterodorsalen tegmentalen Kern) von wo aus sie breitgefächerte Projektionen zum Thalamus und den dopaminergen Arealen des Mittelhirns sowie absteigende Projektionen zur kaudalen Pons und dem Hirnstamm entsenden (Dani und Bertrand, 2007; Everitt und Robbins, 1997; Thiel und Fink; 2007). Der laterodorsale tegmentale Kern projiziert darüber hinaus zum ventralen tegmentalen Areal, während der pedunculopontine Kern zusätzlich zu dieser Struktur die Substantia nigra versorgt (Maskos, 2008; Mena-Segovia et al., 2008; Sesack und Grace, 2010).

Das dritte wichtige cholinerge System (in Abb. 4 schwarz markiert) besteht aus einer Ansammlung cholinerger Interneurone im Striatum. Diese Interneurone stellen je nach Spezies etwa 1-3% der striatalen Neurone dar und bewirken eine hohe lokale Innervation. Hier findet außerdem eine Interaktion mit dopaminergen Neuronen der SNc und dem ventralen tegmentalen Areal statt (Zhou, 2002).

2.2.2. Das cholinerge System innerhalb der Basalganglien

Dem Striatum wird bezüglich Veränderungen der Basalganglien-Funktion bei Bewegungsstörungen wie Morbus Parkinson, Huntington, Dystonie oder Tourette-Syndrom eine besondere Bedeutung beigemessen. Hier findet eine enge Interaktion zwischen DA und ACh statt (Graveland et al., 1985a; Obeso et al., 2000; Wichmann und DeLong, 2003; Augood et al., 2004; Albin und Mink, 2006). Obgleich das Striatum nur einen kleinen Prozentsatz an cholinergen Interneuronen enthält (s.o.), ist diese Struktur eine der am stärksten mit ACh ausgestatten Regionen innerhalb des Gehirns (Graybiel, 1990; Mesulam et al., 1992; Contant et al., 1996). Im Rahmen elektrophysiologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese cholinergen Interneurone eine autonome Aktivität aufweisen, die durch eine langsame und kontinuierliche Feuerrate gekennzeichnet ist. Hinsichtlich ihrer tonischen Aktivität werden cholinerge Interneurone daher auch als "tonisch aktive Neurone" (TANs = tonically active neurons) bezeichnet (Bennett und Wilson, 1999; Apicella, 2007). Die ununterbrochene Aktivität der cholinergen Interneurone sowie deren weitreichende Axonkollateralen lassen eine tonische ACh-Freisetzung und Aktivierung von mAChR sowie nAChR innerhalb des Striatums vermuten (Zhou et al., 2002). Unter physiologischen Bedingungen wird die cholinerge Signalwirkung durch zwei Faktoren reguliert. Zum einen geschieht dies durch die hohe Expression von AChE im Striatum, welche für die Degradierung des extrazellulären ACh zuständig ist (Zhou et al., 2002). Zum anderen erfolgt die Regulierung der ACh-Ausschüttung, wie in Abb. 5 dargestellt, über muskarinerge M4-Autorezeptoren, die eine negative Rückkopplung bewirken, indem das Öffnen der mit der Exozytose gekoppelten Ca2+-Kanäle vermindert wird und das Öffnen von Cav2.1/Cav2.2-Kanälen sowie Kir3 K⁺-Kanälen an den Somata, was mit einer Hyperpolarisation von Membranen sowie einem verminderten Öffnen von Ca²⁺-Kanälen einhergeht, verstärkt wird (Yan und Surmeier, 1996; Calabresi et al., 1998; Ding et al., 2006).

Das autonome Feuern der striatalen cholinergen Interneurone und die Freisetzung von ACh werden darüber hinaus durch Dopamin moduliert, wie in Abb. 5 dargestellt. Cholinerge Interneurone exprimieren sowohl D₂- als auch D₅-Rezeptoren (Yan und Surmeier, 1997; Yan *et al.*, 1997). Die Aktivierung der D₂-Rezeptoren verstärkt die langsame Inaktivierung von Na⁺-Kanälen und vermindert so die autonome Feuerrate (Maurice *et al.*, 2004). Des Weiteren kommt es durch D₂-Rezeptor-Agonisten zu einer Reduktion der synaptischen Signaleingänge infolge einer Inhibition spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle (Yan und Surmeier, 1996; Pisani *et al.*, 2000). Die Aktivierung der vornehmlich somatodentritischen D₅-Rezeptoren bewirkt hingegen eine Depolarisation der Zelle durch die Förderung der nichtselektiven Öffnung von Kationen-Kanälen sowie der Schließung von K⁺-Kanälen, was wiederum die ACh-Ausschüttung erhöht (Damsma *et al.*, 1990; Imperato *et al.*, 1993; DeBoer

et al., 1996; Aosaki *et al.*, 1998; Pisani *et al.*, 2000). Die Aktivität cholinerger Interneurone wird darüber hinaus auch mittels ionotroper glutamaterger (AMPA-, NMDA-Rezeptoren) und GABAerger Rezeptoren reguliert. Die Innervation erfolgt aus thalamischen und/oder kortikalen Strukturen (Calabresi *et al.*, 2000).

Bei der Therapie von Basalganglien-Erkrankungen wie der Parkinson-Krankheit haben sich mAChR-Antagonisten bewährt (Lang und Lees, 2002), wobei die Therapie in der antagonistischen Interaktion zwischen dem dopaminergen und cholinergen Neurotransmittersystem im Striatum begründet ist (Duvoisin, 1967; Hornykiewicz und Kish, 1987). Der verminderte Dopamingehalt bei der Parkinson-Krankheit wird dabei von einer erhöhten striatalen cholinergen Aktivität begleitet, die mit einer anschließenden Neuordnung des striatalen Regelkreises zum Auftreten motorischer Symptome führt. Der Effekt auf die cholinerge Aktivität durch den Verlust dopaminerger Afferenzen ist wahrscheinlich nicht auf das Herabsetzen der D₂-Rezeptor-Aktivität zurückzuführen. Stattdessen löst der verminderte Dopamingehalt eine Verringerung der Effektivität des M4-Autorezeptors und somit eine erhöhte Freisetzung von ACh aus (Ding et al., 2006). In einer aktuellen Veröffentlichung von Ding und Mitarbeitern (2011) wird auf eine unerwartete Rolle cholinerger Interneurone bei Dyskinesien hingewiesen, einer hyperkinetischen Bewegungsstörung, die infolge einer langfristigen L-Dopa-Behandlung bei Parkinson-Patienten beobachtet werden konnte. An Nagermodellen für die Parkinson-Erkrankung konnte gezeigt werden, dass eine wiederholte L-Dopa-Exposition eine Aktivierung der extrazellulären Signal-gesteuerten Kinase 1/2 (ERK 1/2) bewirkt, die wiederum zu einer erhöhten basalen Feuerrate und einer Dopaminabhängigen Exzitation striataler cholinerger Interneurone führt. Diese spezifische Reaktion cholinerger Interneurone korrelierte mit dem Auftreten der Dyskinesien. Demzufolge verringerte ein Muskarin-Rezeptor-Antagonismus das Auftreten L-Dopa-induzierter Dyskinesien.

Im Hinblick auf Dystonien wurde in einer früheren Studie bei Mäusen, die das humane TorsinA einschließlich der für die DYT1-Dystonie verantwortlichen Mutation überexprimieren, eine Veränderung der D₂-Rezeptor-Bindung in cholinergen Interneuronen entdeckt (Pisani *et al.*, 2006). Eine D₂-Rezeptor-Aktivierung führte bei diesen Mäusen, anders als unter physiologischen Bedingungen, zu einer verstärkten anstatt einer verminderten Feuerrate cholinerger Interneurone. Dieser paradoxe Effekt wird mit einer verstärkten funktionellen Bereitschaft von Cav2 Ca²⁺-Kanälen assoziiert, die den Ca²⁺-Einstrom und die physiologische Schrittmacher-Aktivität dieser Neurone reguliert. Die durch die D₂-Rezeptor ausgelöste Verstärkung der Feuerrate könnte in einer erhöhten ACh-Freisetzung resultieren, womit die Effektivität von Anticholinergika bei der Behandlung von Dystonien bei Patienten erklärt werden kann (Pisani *et al.*, 2007).



Abb. 5: Schematische Darstellung zur Interaktion eines cholinergen Interneurons mit anderen Neurotransmittersystemen im Striatum (nähere Erläuterungen s. Text; modifiziert nach Pisani *et al.*, 2007).

2.2.3. Acetylcholinrezeptoren

2.2.3.1. Nikotinerge ACh-Rezeptoren

Ionotrope nikotinerge ACh-Rezeptoren (nAChR) sind auf Nervenzellen im ZNS, auf autonomen Ganglienzellen, vegetativen Nerven sowie in der Muskulatur postsynaptisch an der neuromuskulären Endplatte lokalisiert (Lukas und Bencherif, 1992; Albuquerque *et al.*, 1997). Sie gehören zur Superfamilie der Ligand-gesteuerten Ionenkanäle (McGehee und Roles, 1995; Role und Berg, 1996; Albuquerque *et al.*, 1997; Wonnacott, 1997; Jones *et al.*, 1999; Dani, 2001; Hogg *et al.*, 2003) und reagieren sensibel gegenüber Nikotin. Die nAChR

sind Pentamere, deren Untereinheiten um eine zentral gelegene Kanalpore angeordnet sind (McGehee und Roles, 1995, Jones *et al.*, 1999; Karlin, 2002). Jede Untereinheit (2x α sowie β , γ und δ bzw. ϵ) besteht aus jeweils 4 Transmembrandomänen, welche die Zellmembran durchspannen, einer großen aminoterminalen extrazellulären Domäne und einer variablen zytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne trägt die Bindungsstellen für das ACh, deren Anzahl abhängig von der Zusammensetzung des Pentamers zwischen zwei (muskuläre nAChR oder $\alpha 4\beta 2$ nAChR des Gehirns) und fünf Bindungsstellen (im $\alpha 7$ Homopentamer) variiert (Le Novere und Changeux ,1995; Changeux, 2010). Insgesamt wurden beim Säugetier bis heute 16 Untereinheiten identifiziert ($\alpha 1$ -7 sowie $\alpha 9$ und 10, β 1-4, γ , δ , ϵ), die sich in ihren pharmakologischen und kinetischen Eigenschaften unterscheiden (Albuquerque *et al.*, 2009; Taly *et al.*, 2009). Basierend auf der unterschiedlichen Zusammensetzung dieser Untereinheiten werden neuronale und muskuläre nAChR unterschieden (Galzi und Changeux, 1995).

Infolge einer Aktivierung durch ACh oder Nikotin reagieren nAChR mit einer schnellen Öffnung (µs bis ms Bereich) des kationischen Kanals, der für Na⁺- und K⁺-Ionen, aber auch in einigen Fällen für Ca²⁺-Ionen durchlässig ist und es kommt zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran.

Während nAChR des peripheren Nervensystem für die Vermittlung schneller und phasischer Effekte einer lokal kurzanhaltenden hohen ACh-Konzentration verantwortlich sind, fungieren nAChR des Gehirns, trotz einiger dokumentierter Beispiele für eine schnelle Übertragung, vielmehr als Zielstruktur für tonisch freigesetztes ACh in einer niedrigen modulatorischen Konzentration (Changeux, 2010).

Zu den beiden wichtigsten neuronalen nAChR gehören das α 7 Homo-Oligomer, das durch eine schnelle Aktivierung, eine geringe Affinität und eine hohe Ca²⁺-Permeabilität geprägt ist sowie das α 4 β 2 Hetero-Oligomer, das sich durch eine hohe Affinität und eine langsame Desensibilisierung auszeichnet (Changeux und Edelstein, 2005; Taly *et al.*, 2009).

Eine Aktivierung präsynaptischer oder außerhalb der Synapse (präterminal, axonal, etc.) gelegener nAChR hat zudem modulatorischen Einfluss auf eine Vielzahl unterschiedlicher Neurotransmitter (zur Übersicht s. Dani, 2007). So führt die Aktivierung präsynaptischer nAChR beispielsweise zu einer verstärkten Freisetzung von GABA bei GABAergen Interneuronen des Ncl. interpeduncularis (Lena *et al.*, 1993).

2.2.3.2. Muskarinerge ACh-Rezeptoren

Muskarinerge ACh-Rezeptoren (mAChR) sind metabotrope Rezeptoren im peripheren und zentralen Nervensystem, die nach Muskarin, dem Toxin des Pilzes "Amanita muskaria", benannt wurden (Löscher, 2002). Ihnen kommt eine bedeutende Rolle bei der Regulation verschiedener vegetativer Prozesse zu wie beispielsweise der Herzfrequenz und der Körper-

temperatur. Des Weiteren sind sie an der Kontrolle komplexer Verhaltensprozesse, die Schmerzwahrnehmung, Gedächtnisfunktion und Lernen einschließen, beteiligt (Caulfield und Birdsall, 1998; Birdsall et al., 2001; Duttaroy et al., 2002). mAChR gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (kurz GPCR, engl.: G protein-coupled receptor). Bisher wurden fünf verschiedene Rezeptorsubtypen (M1-M5) identifiziert, sequenziert und bezüglich ihrer Bindungseigenschaften klassifiziert (Caulfield und Birdsall, 1998). Interessanterweise weisen die klonierten mAChR der verschiedenen Säugetierspezies, insbesondere die von Maus, Ratte und Mensch, eine hohe Übereinstimmungsrate in der Sequenz, der Identität sowie der Pharmakologie auf (Bymaster et al., 2003). Das Rezeptor-Proteinmolekül besteht aus einer zusammenhängenden Kette aus etwa 400-500 Aminosäuren. Diese durchspannt die Plasmamembran in Form von sieben hydrophoben transmembranären Domänen (TM1-TM7), die eine α -Helixstruktur aufweisen und über drei extrazelluläre (e1-e3) und drei intrazelluläre Schleifen (i1-i3) verbunden sind (Hulme et al., 1990). Wie in Abb. 6 dargestellt, ragt das aminoterminale Ende (N-Terminus) der Aminosäurenkette auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran heraus und weist Bindungsstellen für die Glykolisierung auf, die aber weder für die Expression noch für die Funktion der mAChR relevant sind. Das Carboxylende (C-Terminus) hingegen befindet sich auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran und enthält Cysteinreste (van Koppen und Nathanson, 1990). Die transmembranären Domänen sind ringförmig angelegt und bilden die Bindungstasche für den endogenen Agonisten ACh (Baldwin, 1994). Diese als orthosterische Bindungsstelle bezeichnete Struktur weist eine hohe Übereinstimmung (mind. 90%) der Aminosäuresequenz auf und ist innerhalb der fünf Subtypen konserviert. Die hohe Konservierung der Bindungsstelle erschwert die Entwicklung subtypspezifischer Liganden, so dass es bisher an selektiven Liganden mangelt (Caulfield und Birdsall, 1998) und daher Einzelheiten zur genauen Lokalisation der mAChR, deren Funktion sowie deren Rolle bei neurologischen Erkrankungen bislang weitestgehend unklar ist (Servent und Fruchart, 2009). Die hydrophilen zytoplasmatischen Domänen sowie die extrazellulären Schleifen und Überhänge hingegen zeigen deutliche Unterschiede, welche die verschiedenen Kopplungseigenschaften innerhalb der fünf mAChR-Subtypen erklären könnten.

mAChR sind auf der zytoplasmatischen Seite an sogenannte heterotrimere Guanin-bindende Proteine (G-Proteine) gekoppelt, die wiederum die Aktivität nachgeschalteter Effektorproteine beeinflussen. An der Bindung dieser G-Proteine sind insbesondere die transmembrandomänennahen Aminosäuren der zweiten (i2) und dritten (i3) intrazellulären Schleife sowie der sich an die 7. transmembranäre Domäne anschließende C-terminale Rest beteiligt. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (α , β , γ). Durch Bindung eines Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und infolgedessen zu einer Aktivierung des G-Proteins. Das im inaktiven Zustand an die α -Untereinheit des G- Proteins gebundene Guanosindiphosphat (GDP) wird daraufhin durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt. Als Folge ändert der G-Protein-Komplex seine Konformation und zerfällt in zwei aktivierte Komponenten (eine α - und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit), die ihrerseits an vielfältige Effektoren binden und somit die Signalkaskade in der Zelle auslösen.



 M_1, M_3, M_5

Abb. 6: Vereinfachte schematische Darstellung der Signaltransduktion durch mAChR. M1-, M3und M5-AChR binden an stimulierende Gq-Proteine, während M2- und M4-AChR an inhibitorische Gi/o-Proteine binden. Gq (stimulierend, q für chemotaktisch): Bei Aktivierung wird durch das G-Protein die Phospholipase C aktiviert, welche wiederum ein Phospholipid in Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. Gi (inhibierend): Bei Aktivierung wird durch das G-Protein die Adenylatcyclase gehemmt und es wird weniger cAMP gebildet. Weiterhin ist zu beachten, dass auch verschiedene andere Effektoren durch aktive mAChR moduliert werden können (z.B. Ionenkanäle und andere Proteinkinasen). Aminosäuren, die an der orthosterischen Bindungsstelle von mAChR beteiligt sind, befinden sich im Bereich der transmembranären Domänen. Im Gegensatz hierzu sind die an den vermeintlichen allosterischen Bindungsstellen der mAChR beteiligten Aminosäuren "ektopisch" lokalisiert (modifiziert nach Digby *et al.*, 2010).

mAChR werden basierend auf ihren strukturbedingten Bindungseigenschaften in zwei funktionell unterschiedliche Klassen unterteilt. Wie in Abb. 6 dargestellt, binden M1-, M3- und M5-Rezeptoren an stimulierende Gq-Proteine (q für chemotaktische), über die infolge der Rezeptoraktivierung die Phospholipase C (PLC) aktiviert wird, die ihrerseits die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat (PIP2) in die beiden second messenger Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) bewirkt. IP₃ erhöht die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration durch die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Der andere second messenger, DAG, aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die wiederum die Phosphorylierung von Membrankanälen und anderen Proteinen bewirkt. Im Gegensatz dazu verringern M2- und M4-Rezeptoren durch die

Aktivierung von Gi/o-Proteine (i für inhibitorisch; o für olfaktorisch) die cAMP-Konzentration und inhibieren somit die Zelle. Dies kann einerseits über die Inhibition der Adenylatcyclase, andererseits über die Stimulation der Phosphodiesterase, die cAMP durch Hydrolyse zu AMP abbaut, erfolgen (Caulfield, 1993). Darüber hinaus sind alle mAChR in der Lage, eine signalabhängige Kinase (ERK) zu aktivieren, ein Signalprotein, das in Zellwachstum, Differenzierung und das Überleben der Zelle sowie zahlreiche ZNS-Funktionen involviert ist (Hulme *et al.*, 2003).

Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern für die jeweiligen Rezeptorsubtypen ergaben für Hirnregionen, die mit zahlreichen Erkrankungen des ZNS in Verbindung gebracht wurden, verschiedenartige, teils aber auch überlappende Lokalisationen der fünf mAChR. Im Neokortex und Hippocampus wird hauptsächlich der mAChR Subtyp 1 exprimiert, der mit 35-60% den Großteil muskarinerger Bindungsstellen stellt. Des Weiteren sind M1-Rezeptoren in somatodentritischen Regionen pyramidaler Neurone des Striatums verbreitet. Ihre postsynaptische Lokalisation auf asymmetrischen Synapsen bestätigt zudem ihre Rolle in der cholinergen Modulation der glutamatergen Neurotransmission. Im Gegensatz dazu werden M4-Rezeptoren im Neokortex und Hippocampus nur spärlich exprimiert, weisen dafür aber eine hohe Dichte im Striatum auf. M2-Rezeptoren sind über das gesamte Gehirn, einschließlich Neokortex und Hippocampus, verteilt und werden auch auf nicht-cholinergen Neuronen exprimiert, die diese Regionen versorgen. M3-Rezeptoren kommen hauptsächlich im Hippocampus vor, während M5-Rezeptoren allgemein nur in einem geringen Ausmaß im Gehirn exprimiert werden (Levey et al., 1991; Levey et al., 1995; Levey, 1996; Hersch et al.; 1994; Mrzljak et al., 1993). Dieses Verteilungsmuster führt zu der Annahme, dass jeder mAChR auf unterschiedliche Art und Weise an der cholinergen Modulation zentraler Regelkreise beteiligt ist. Des Weiteren werden insbesondere mAChR vom Subtyp M1 und M4 aufgrund ihrer hohen Expression in Hirnregionen, die mit einer Vielzahl an ZNS-Erkrankungen (bsp. der Alzheimer-Krankheit oder Schizophrenie) assoziiert werden, als vielversprechende therapeutische Zielstrukturen angesehen. So wird beispielsweise die kognitive Beeinträchtigung bei der Alzheimer-Krankheit auf den Verlust cholinerger Funktionen zurückgeführt, wobei der M1-Rezeptor eine zentrale Rolle spielt (Langmead et al., 2008). Ein hochselektiver M1-Agonist könnte das Potential haben, die cholinerge Funktion wiederherzustellen und somit die Progression der Krankheit zu mildern. Dieser Effekt könnte durch die Blockade des präsynaptischen M2-Rezeptors mittels eines Antagonisten sogar verstärkt werden, wodurch der Gehalt an ACh im synaptischen Spalt zusätzlich erhöht würde (Servent und Fruchart, 2009). Bei der Parkinson-Krankheit hingegen wurde erst vor kurzem die potentielle Bedeutung des M4-Rezeptors für die Wiederherstellung der DA/ACh-Balance postuliert (Langmead et al., 2008). Jüngste Erkenntnisse führten außerdem zu der Annahme, dass Defizite von mAChR, insbesondere

von M1- und M4-Rezeptoren, mit einigen Formen der Schizophrenie in Verbindung stehen (Scarr und Dean, 2008). Obwohl mAChR vielversprechende Zielstrukturen für die Behandlung von zahlreichen ZNS-Erkrankungen darstellen, ist es trotz erheblicher Bemühungen bis heute nicht gelungen, muskarinerge Liganden mit ausgeprägter Selektivität für die einzelnen Subtypen zu entwickeln. Grund hierfür ist die hohe Sequenzhomologie der orthosterischen Bindungsstelle innerhalb der fünf Rezeptorsubtypen, die eine Entwicklung hochselektiver muskarinerger Agonisten bzw. Antagonisten erschwert. Die mangelnde Selektivität führt außerdem zur Aktivierung bzw. Blockade peripherer mAChR, insbesondere M2- und M3-Rezeptoren, sodass der therapeutische Einsatz cholinerger Substanzen häufig mit zahlreichen Nebenwirkungen behaftet ist (Greenlee *et al.*, 2001). Die Entdeckung hochselektiver allosterischer Liganden wird heutzutage als eine vielversprechende Neuerung in der Entwicklung von Therapeutika zur Behandlung von ZNS-Störungen gesehen.

2.2.4. Allosterische Modulation

Zusätzlich zu der bereits beschriebenen orthosterischen Bindungsstelle weisen alle fünf mAChR-Subtypen eine zweite, sog. allosterische Bindungsstelle auf, die im Rahmen zahlreicher Untersuchungen bereits gut charakterisiert wurde (zur Übersicht s. De Amici et al., 2010). Sie liegt im Bereich der extrazellulären Schleifen (s. Abb. 6) und ist im Vergleich zur orthosterischen Bindungsstelle weniger stark konserviert (Ellis et al., 1993; Leppik, 1994; Voigtländer et al., 2003). Allosterische Liganden, auch allosterische Aktivatoren bzw. allosterische Modulatoren genannt, zeichnen sich durch eine sehr hohe Subtyp-Selektivität aus und sind in der Lage, die Bindung orthosterischer Liganden an den Rezeptor zu modulieren. Sie haben eine oder mehrere pharmakologische Eigenschaften, die ihnen erlauben, modulatorisch Einfluss auf die Affinität oder Wirksamkeit orthosterischer Liganden zu nehmen oder in Form von Agonisten bzw. inversen Agonisten zu agieren (Conn et al., 2009). In den letzten Jahren wurde für fast alle GPCR-Familien, einschließlich metabotroper glutamaterger, serotonerger und Adenosin-Rezeptoren, eine Vielzahl an allosterischen Aktivatoren identifiziert (zur Übersicht s. May und Christopoulos, 2003 sowie Conn et al., 2009). Hinsichtlich der mAChR, insbesondere der Subtypen M1 und M4, wurden die größten Fortschritte durch die Entdeckung positiver allosterischer Modulatoren (sog. PAMs, engl.: positive allosteric modulators) sowie allosterischer Agonisten erzielt. PAMs können einen Rezeptor nur indirekt aktivieren, indem sie die Affinität des Rezeptors für den orthosterischen Liganden steigern. Es wird vermutet, dass hierbei die Bindung des Allosters zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und somit zu Veränderungen der funktionellen Eigenschaften, als auch der Bindungseigenschaften orthosterischer Liganden führt. Allosterische Agonisten hingegen können einen Rezeptor auch ohne die Anwesenheit eines endogenen Liganden direkt aktivieren (Digby et al., 2010). Eine der ersten Substanzen, bei
der ein allosterischer Effekt gegenüber mAChR verzeichnet wurde, war das aus der Strychnos nux vomica (Brechnuss) isolierte Alkaloid Brucin (Lazareno et al., 1998). Brucin ist ein schwacher PAM am M1-Subtyp, der die Affinität des Rezeptors gegenüber dem endogenen Liganden ACh um das Zweifache steigern konnte, jedoch in sehr hohen Konzentrationen benötigt wird, sodass er für in-vivo Versuche gänzlich ungeeignet war (Jakubik et al., 1997). Dennoch war diese Entdeckung ein Beweis für die Hypothese, dass es möglich ist, Substanzen mit einer ausgeprägten Subtyp-Selektivität für die einzelnen mAChR zu entwickeln. Es folgte die Identifizierung weiterer allosterischer Modulatoren, wie dem für den M4-Subtyp selektiven PAM Tiochrom (Lazareno et al., 2004) sowie die Entdeckung des ersten M1-selektiven allosterischen Agonisten AC-42 (Spalding et al., 2002). So entstanden in den letzten Jahren zahlreiche neue allosterische Substanzen, die bezüglich ihrer Selektivität, ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften sowie ihrer ZNS-Gängigkeit stetig verbessert wurden und mit deren Hilfe neue Einblicke in die Struktur und Funktion der mAChR gewonnen werden konnten. Erst kürzlich wurden wieder zwei strukturell verwandte Moleküle entdeckt, die als besonders potentielle, hochselektive PAMs am M4-Rezeptor beschrieben werden. Über eine Steigerung der Affinität des M4-Rezeptors für den endogenen Agonisten ACh, sowie eine gesteigerte Kopplung des Rezeptors an das G-Protein, bewirken die beiden Substanzen LY2033298 (Chan et al., 2008) und VU10010 (Shirey et al., 2008) eine annähernd 50-fache drastische Linksverschiebung der ACh-Konzentrations-Antwort-Kurve. VU10010 ist in hippocampalen Neuronen aktiv, wo es die M4-vermittelte Depression der Übertragung an exzitatorischen glutamatergen Synapsen verstärkt. Des Weiteren wurden Analoga zu VU10010 optimiert, um zwei Blut-Hirn-Schranken gängige Moleküle, VU0152099 und VU0152100, zu entwickeln (Brady et al., 2008). Beide Substanzen erreichen nach systemischer Gabe signifikante Konzentrationen im sind Gegensatz zu VU10010 aufgrund ihrer verbesserten Gehirn und im pharmakokinetischen Eigenschaften für den Einsatz in Verhaltenstests geeignet. Hierbei zeigte sich, dass sowohl VU0152099, als auch VU0152100 in der Lage sind, die Amphetamin-induzierte Hyperlokomotion in Ratten aufzuheben (Brady et al., 2008).

Mittlerweile gibt es zahlreiche Befunde präklinischer und klinischer Studien, die eine Wirksamkeit von allosterischen Agonisten und PAMs *in-vivo* aufzeigen und somit deren Einsatz als neue Therapeutika zur Behandlung zahlreicher ZNS-Störungen in Aussicht stellen (Conn *et al.*, 2009). Dennoch liegen bis zum heutigen Zeitpunkt keine Veröffentlichungen zu negativen allosterischen Modulatoren (NAMs, engl.: negative allosteric modulators) an mAChR vor. Eine Entdeckung dieser Art könnte einen neuen therapeutischen Fortschritt für die Behandlung von Erkrankungen wie der Dystonie, Morbus Parkinson oder Epilepsie bedeuten. Aufgrund von Erkenntnissen bei anderen Rezeptoren der GPCR-Familie wie etwa den Glutamatrezeptoren, für die bereits NAMs nachgewiesen

werden konnten (O'Brien *et al.,* 2003; Sharma *et al.,* 2008), erscheint die Entdeckung von NAMs für mAChR möglich.

2.3. Dystonien

2.3.1. Definition und Bedeutung

Dystonien repräsentieren neben Morbus Parkinson und essentiellem Tremor die dritthäufigste Bewegungsstörung des Menschen und spiegeln sich in einer Vielzahl klinisch heterogener Erscheinungsbilder wider. Sie werden als ein neurologisches Syndrom definiert, das durch anhaltende unwillkürliche Muskelkontraktionen zu schraubenartigen Bewegungen und abnormen Körperhaltungen führt (Fahn et al., 1987). Obwohl bereits zum Ende des 19. Jahrhunderts erste Krankheitsbilder bei Dystoniepatienten (Goetz et al., 2001) beschrieben wurden, wurde der Begriff "Dystonie" (griech. dys = miss-, krankhaft; lat. tonus = Spannung) erstmals im Jahre 1911 von dem Berliner Neurologen Oppenheim zur Beschreibung eigenartiger, unwillkürlich auftretender hypotoner bzw. spastischer Muskelantworten eingeführt. Anfangs als Dystonia musculorum deformans bezeichnet, ist diese Störung heute besser als generalisierte Torsionsdystonie oder auch Oppenheimsche Dystonie bekannt (Oppenheim, 1911; Barret und Bressmann, 2011). Hauptcharakteristikum dystoner Störungen sind gleichzeitige Muskelkokontraktionen agonistischer und antagonistischer Muskelgruppen, die auch benachbarte Muskelgruppen einbeziehen können (Tanabe et al., 2009). Hierbei sind wiederholt dieselben Muskelgruppen betroffen (Geyer und Bressman, 2006). Die Ausprägung der Dystonie ist stark kontextabhängig. So tritt sie in Ruhe meist nur gering in Erscheinung, während sie durch Triggerfaktoren wie beispielsweise der wiederholten Ausübung bestimmter Bewegungen, Stress oder Müdigkeit ausgelöst oder verstärkt wird (Fahn et al., 1988).

Die Prävalenz primärer Dystonien wird auf Basis von verschiedenen epidemiologischen Studien mit einer Häufigkeit von etwa 2 bis 7320 Fällen/Mio. angegeben (zur Übersicht s. Defazio, 2010). Bezieht man die sekundären Dystonieformen mit ein, so wird eine Gesamtprävalenz aller Dystonien je nach Literaturangabe mit einer Häufigkeit zwischen 40/100.000 bis 1800/100.000 beschrieben (Nutt *et al.*, 1988; Wenning *et al.*, 2005). Da aufgrund der klinischen Heterogenität die eigentliche Erkrankung häufig nicht oder erst sehr spät diagnostiziert wird, muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die tatsächliche Prävalenz weitaus höher einzuschätzen ist.

Im Bereich der Forschung gibt es heutzutage mehrere phänotypische und genotypische Tiermodelle für die unterschiedlichen Dystonieformen, die insbesondere Nager, aber auch Insekten sowie Primaten einschließen. Bei unseren Haussäugetieren hingegen werden nur einige wenige Fälle dystoner Bewegungsstörungen beschrieben. So wurden beispielsweise

Literaturübersicht

neurologisch bedingte Bewegungsstörungen bei mehreren Hunderassen wie dem Scotch Terrier, dem Cavalier King Charles Spaniel, dem Boxer oder dem Chinook beobachtet, die Parallelen zu der primären paroxysmalen Dystonie erkennen lassen (Clemmons *et al.*, 1980; Rusbridge, 2005; Ramsey *et al.*, 1999; Packer *et al.*, 2010). Aber auch bei Pferden wurden dystone Symptome im Bereich der Nüstern und der Zunge beschrieben, die mit Läsionen innerhalb gewisser Hirnregionen in Verbindung gebracht werden (Chang *et al.*, 2011). Darüber hinaus wird bei Rindern der Rasse Weißblauer Belgier die sog. kongenitale muskuläre Dystonie (CMD) vom Typ 1 und 2 beschrieben, die sich bei den betroffenen Kälbern in Form episodisch auftretender Muskelkontraktionen äußert (Harvey *et al.*, 2008; Charlier *et al.*, 2008). In der Veterinärmedizin werden dennoch bislang nur selten dystone Störungen beschrieben, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf die erschwerte Diagnosestellung und die mangelnde Kenntnis zur Pathophysiologie der Dystonie zurückzuführen ist.

2.3.2. Einteilung und Genetik der Dystonie

Dystonien werden den Dyskinesien zugeordnet, die in Form abnormaler, ungewollter Bewegungen als Kennzeichen hyperkinetischer Bewegungsstörungen auftreten. Heutzutage wird der Begriff Dyskinesie allerdings bevorzugt für episodisch auftretende choreoathetotische und dystone Symptome (paroxysmale Dyskinesien) sowie für Medikamenteninduzierte Bewegungsstörungen (z.B. L-Dopa-induzierte Dyskinesien) verwendet (Conrad, 1996). Die klassische Einteilung von Dystonien basiert auf drei separaten Gesichtspunkten: ihrer Ätiologie, dem erstmaligen Auftreten der Erkrankung sowie nach ihrer topischen Verteilung (Albanese et al., 2010). Aus ätiologischer Sicht können primäre (idiopathische) von sekundären (symptomatischen) Dystonien unterschieden werden. Bei der primären Form ist die Dystonie mit der möglichen Ausnahme eines Tremors oder Myoklonus das einzige Symptom der Erkrankung und ihre Ursache ist meist genetisch bedingt oder weitestgehend unbekannt. Bei der sekundären Form hingegen kann die Dystonie als Begleiterscheinung anderer Erkrankungen auftreten und ihre Ursache ist meist bekannt (Schmidt und Klein, 2010). In Bezug auf ihr erstmaliges Auftreten werden Dystonien in infantile (0-12 Jahre), juvenile (13-20 Jahre) und adulte (>20 Jahre) Formen unterteilt (Fahn et al., 1998). Diese Unterteilung hat eine wichtige prognostische Bedeutung, da in der Kindheit oder im Jugendalter auftretende Dystonien meist eine hereditäre Ursache aufweisen und sich im fortschreitenden Alter zu einer generalisierten Form weiterentwickeln können, während Dystonien, die nach dem 25. Lebensjahr entstehen, meist fokal oder segmental begrenzt bleiben (Geyer und Bressman, 2006). Nach der topischen Symptomverteilung werden fokale (eine Körperregion betreffend z.B. Blepharospasmus, Schreibkrampf), segmentale (betreffen zwei oder mehr benachbarte Regionen z.B. Meige-Syndrom),

multifokale (verschiedene nicht benachbarte Körperregionen sind betroffen), **Hemidystonien** (ipsilateral betroffene Körperregionen) und **generalisierte** Dystonien (beide Beine sowie mindestens ein weiterer Körperteil, meist ein oder beide Arme, sind betroffen) unterschieden (Bressman, 2004; Albanese *et al.*, 2010). Diese Klassifizierung ist besonders für die weiterführende Diagnostik und die Wahl einer geeigneten Therapie ausschlaggebend.

Den sekundären Dystonien liegt eine Vielzahl diverser Ursachen zugrunde. So können sie mit neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Chorea Huntington, juveniles Parkinsonsyndrom) oder metabolischen Störungen (z.B. Morbus Wilson) einhergehen. Aber auch Medikamente (insbesondere Neuroleptika und Calciumkanalblocker), Toxine (z.B. Kohlenstoffmonoxid) und Gehirnläsionen, die meist infolge vaskulärer Erkrankungen, viraler Infektionen oder Demyelinisierungsvorgängen entstehen, kommen als Auslöser in Betracht (Breakefield *et al.*, 2008).

Primäre Dystonien hingegen entwickeln sich spontan und ohne erkenntliche Ursache. Pathomorphologische Veränderungen innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) oder angeborene Stoffwechselstörungen lassen sich mittels Standardtechniken bei dieser Dystonieform nicht nachweisen (Geyer und Bressman, 2006).

In den letzten 25 Jahren jedoch wurden für eine Reihe von primären Dystonien verschiedene Gendefekte identifiziert (Bressman, 2004). So haben früh auftretende primäre Dystonien, wie die generalisierte Torsionsdystonie häufig eine genetische Ursache. Aber auch Formen mit späterem Beginn, die meist fokal begrenzt auftreten, wie beispielsweise Blepharospasmen (ein- oder beidseitiger Lidkrampf) oder Hand-Dystonien (Schreibkrampf oder Musikerkrampf), lassen eine genetische Prädisposition vermuten (Breakefield *et al.*, 2008). Mittlerweile werden 20 verschiedene Formen monogener Dystonien unterschieden, allerdings sind nicht alle Gene der betroffenen Genloci identifiziert (Müller, 2009). In Tab. 1 sind die bisher bekannten genetisch bedingten Dystonien mit ihren Charakteristika wie Genort, Genprodukt und Erbgang zusammengefasst. Die genetische Kategorisierung, die die einzelnen Dystonieformen mit DYT1-20 bezeichnet, dient hierbei nicht als Klassifikation im eigentlichen Sinne. Sie stellt stattdessen eine chronologische Aufzählung der klinisch und genetisch verschiedenen monogenen Dystonieformen gemäß ihrer erstmaligen Erscheinung in der Literatur dar (Schmidt und Klein, 2010).

Neben autosomal-dominant vererbten Formen sind auch Dystonien bekannt, die autosomalrezessiv oder x-chromosomal-rezessiv vererbt werden (Tarsy und Simon, 2006). Die meisten monogenen Dystonieformen resultieren aus autosomal-dominanten Erbgängen mit einer geringen Penetranz. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass neben dem eigentlichen Gendefekt weitere auslösende Faktoren wie Umwelteinflüsse, Virusinfektionen oder andere modifizierende Gene auf die Ausprägung der Dystonie Einfluss nehmen (Klein

24

et al., 2007). So stellen genetische Einflüsse wahrscheinlich einen wichtigen, aber nicht ausschließlichen Faktor in der Manifestation der Dystonie dar (Peterson *et al.*, 2010). Im Falle der generalisierten Early-onset-Torsionsdystonie (DYT1) beispielsweise, hat ein codierender Polymorphismus im Wildtyp-Allel einen dramatischen Effekt auf die Penetranz (Risch *et al.*, 2007) und in einigen anderen Fällen wird das erstmalige Auftreten der Erkrankung häufig mit Verletzungen, Hypoxie oder viralen Infektionen in Verbindung gebracht (Edwards *et al.*, 2003; Saint Hilaire *et al.*, 1991). Diese Interaktionen zwischen Umwelt und Genen stellen eine Verbindung zwischen primären und sekundären Dystonien dar und weisen auf Risikofaktoren bei Individuen mit einer vererbbaren Disposition hin, die intrinsisch und extrinsisch gesteuerte physiologische Zustände einschließt (Breakfield *et al.*, 2008).

Monogene primäre Dystonien							
Abk.	Dystonieform	Erbgang	Genort	Genprodukt			
DYT 1	Generalisierte TD mit frühem Beginn	Autosomal- dominant	9q34	TorsinA			
DYT 2	Generalisierte TD mit kranio- cervicaler Beteiligung	Autosomal- rezessiv	_	_			
DYT 3	X-chromosomales Dystonie-Parkinson-Syndrom "Lubag"	X- chromosomal -rezessiv	Xq13.1	Gentranskriptionsfaktor TAF 1			
DYT 4	"Nicht-DYT1"-TD Hereditary whispering dysphonia	Autosomal- dominant	_	_			
DYT 5 a		Autosomal	14022.1				
(DYT 14 ²)	Dopa-responsives Dystonie- Parkinson-Syndrom	dominant	q22.2	GTP-Zyklohydrolase 1			
DYT 5 b	TH-DRD	Autosomal- rezessiv	11p15.5	Tyrosinhydroxylase			
	Dopa-responsive Dystonie SPR-DRD	Autosomal- rezessiv	_	Sepiapterin-Reduktase			
DYT 6	Gemischte TD mit Beginn im frühen Erwachsenenalter	Autosomal- dominant	8p11.21	Transkriptionsfaktor THAP1			
DYT 7	Fokale TD mit Beginn im Erwachsenenalter	Autosomal- dominant	18p	_			
DYT 8	Paroxysmale dystone Choreoathetose ,PDC, PNKD1	Autosomal- dominant	2q35	Myofibrillogeneseregulator 1			
DYT 10	Paroxysmale kinesiogene dystone Choreoathetose	Autosomal- dominant	16p11.2- q12.1	_			
DYT 11	Myoklonusdystonie	Autosomal- dominant	7q21	E-Sarkoglykan			
DYT 12	Dystonie-Parkinson-Syndrom mit plötzlichem Beginn	Autosomal- dominant	19q13	α3-Untereinheit einer Na⁺-K⁺-ATPase			
DYT 13	Segmentale TD mit juvenilem Beginn	Autosomal- dominant	1p36.13- 36.32	_			
DYT 15	Myoklonusdystonie	Autosomal- dominant	18p11	_			
DYT 16	Generalisierte TD mit frühem Beginn	Autosomal- rezessiv	2q	Stressantwortprotein PRKRA			
DYT 17	Autosomal rezessive Torsionsdystonie	Autosomal- rezessiv	20p11.2 2-q13.12	_			
DYT 18	Paroxysmale aufgabenspezifische Dyskinesie	Autosomal-	1p31.3- p35	Glucosetransporter			
(DYT 9 ³)	Paroxysmale dystone Choreoathetose mit episodischer Ataxie und Spastizität ³	dominant	1p21- p13.3	SLC2A1			
DYT 19	Episodische kinesiogene Dyskinesie	Autosomal- dominant	16q13- q22.1	_			
DYT 20	PNKD2 (s.o.)	Autosomal- dominant	2q31	_			

Tab.1: Übersicht über die bisher bekannten monogenen primären Dystonien (modifiziert nach Schmidt und Klein, 2010 sowie Spatola und Wider, 2012); (TD = Torsionsdystonie) ²DYT 14 wurde kürzlich als DYT 5 neu definiert (Wider *et al.,* 2008). ³DYT 9 und DYT 18 ist eine Mutation in demselben Gen ursächlich (Weber *et al.,* 2011).

2.3.2.1. Die Early-onset-Torsionsdystonie (TD)

Die häufigste genetisch bedingte Dystonieform ist die Early-onset-TD (Oppenheimsche Dystonie, DYT1). Diese Dystonieform beruht auf einer Mutation im DYT1-Gen, das auf Chromosom 9g32-g34 liegt. Der beteiligte Gendefekt führt hierbei zu einer Deletion von drei Basenpaaren (Guanin-Adenosin-Guanin, ∆GAG) in Exon 5 des DYT1-Gens und damit zum Verlust einer Glutaminsäure an Position 302/303 in der Carboxylgruppe des Hitzeschockproteins TorsinA (TA) (Ozelius et al., 1997). Die Erkrankung beginnt meist zwischen dem 5. und dem 28. Lebensjahr, einer bedeutenden Entwicklungsphase, die vom motorischen Lernen aber auch einer hohen Störanfälligkeit geprägt ist (Breakfield et al., 2008). Vereinzelt werden auch Fälle mit Erstmanifestation im Erwachsenenalter beschrieben (Edwards et al., 2003; Gambarin et al., 2006). Während zu Beginn meist eine Extremität betroffen ist, neigt die Erkrankung in zwei Dritteln der Fälle zu einem progressiven Verlauf mit hoher Generalisierungstendenz. Bei einem Drittel der Patienten hingegen bleibt diese Dystonieform fokal begrenzt, meist in Form eines Schreibkrampfes oder einer bibrachialen Dystonie (Geyer und Bressman, 2006). Trotz des zugrundeliegenden autosomal-dominanten Erbgangs zeigen lediglich 30-40% der Genträger dystone Symptome. Die Prävalenz dieser Dystonieform ist in Familien der Ashkenazi Juden mit ca. 1/9000 im Vergleich zur Gesamtbevölkerung mit etwa 1/160000 besonders hoch (Bressman et al., 2000). Über welche Mechanismen dieser Gendefekt und das mutierte TorsinA-Protein letztendlich zur Erkrankung führen, ist jedoch weitestgehend unbekannt.

2.3.2.2. Die paroxysmale non-kinesiogene Choreoathetose

Paroxysmale Dystonien, die auch als paroxysmale Dyskinesien bezeichnet werden, treten meist in der Kindheit oder Jugend erstmals in Erscheinung (Tarsy und Simon, 2006). Dyskinesien Gruppe Paroxysmale stellen eine seltene hyperkinetischer Bewegungsstörungen dar, die durch periodisch auftretende Episoden unwillkürlicher Bewegungen mit dystonen, choreatischen, athetotischen oder ballistischen Symptomen charakterisiert sind (Fahn, 1994). Dabei ist das Bewusstsein der Betroffenen stets ungetrübt (Bhatia, 2001), was eine Abgrenzung zu epileptischen Anfällen ermöglicht. Sie können spontan auftreten oder durch bestimmte Auslöser wie beispielsweise prolongierte körperliche Anstrengung, Erschöpfung, Hunger usw. getriggert werden. In Abhängigkeit von den auslösenden Faktoren, der Frequenz und Dauer der Attacken sowie deren Ansprechbarkeit auf verschiedene Therapieformen können paroxysmale Dyskinesien in vier Kategorien unterteilt werden: die paroxysmale kinesiogene Dyskinesie (PKD), die paroxysmale nichtkinesiogene Dyskinesie (PNKD), die paroxysmale übungsinduzierte (exercise-induced, exertion-induced) Dyskinesie (PED) und die paroxysmale hypnogene Dyskinesie (PHD)

(Weber und Lerche, 2009; Demirkiran und Jankovic, 1995). Letztere wird mittlerweile als eine Form der Frontallappen-Epilepsie gesehen (Mink, 2007). Die PKD und die PNKD repräsentieren die größte Gruppe der paroxysmalen Dyskinesien. Die PKD ist charakterisiert durch plötzlich einsetzende dystone Episoden, die meist infolge abrupter Bewegungen entstehen und neben choreiformen auch ballistische Elemente enthalten können (Kertesz, 1967). Die Frequenz dieser dystonen Episoden ist variabel. Sie können bis zu 100 Mal täglich auftreten und dauern wenige Sekunden bis zu einigen Minuten an. Die PKD spricht besonders gut auf Therapien mit Antiepileptika wie Carbamazin und Phenytoin an (Bruno et al., 2004; Metha et al., 2009; Unterberger et al., 2007). Die PNKD, kurz paroxysmale Dystonie genannt, ist hingegen medikamentös deutlich schlechter behandelbar. Eine Therapie mit Clonazepam oder Azetazolamid wird empfohlen. Anders als bei der PKD wird die PNKD nicht infolge willkürlicher Bewegungen ausgelöst, sondern tritt spontan auf. Dabei kann die dystone Symptomatik durch Koffein, Alkohol, Stress sowie Schlafentzug verstärkt werden. Die dystonen Episoden der PNKD dauern im Vergleich zu PKD weitaus länger an und erstrecken sich von wenigen Minuten bis hin zu einigen Stunden. In der Zeit zwischen den einzelnen Episoden sind die Betroffenen unauffällig (Breakfield et al., 2008). Häufig nehmen diese Episoden mit zunehmendem Alter an Häufigkeit und Schwere ab (Unterberger et al., 2007). In mehreren Familien konnte durch molekulargenetische Untersuchungen eine Kopplung mit dem Chromosom 2q nachgewiesen werden (Fink et al., 1996), die mit einer Mutation im Myofibrilloregulator-1-Gen (MR-1) einhergeht. Die genaue Funktion des MR1-Genproduktes ist noch weitestgehend unklar, es scheint jedoch homolog zu einem Enzym zu sein, das eine entscheidende Rolle in Glutathion-abhängigen Stoffwechselprozessen spielt (Hydroxyacylglutathion Hydrolase - HAGH). HAGH ist in die Degradierung des Substrates Methylglyoxal involviert, das interessanterweise in beachtlichen Mengen in Kaffee und Alkohol nachgewiesen wurde. Außerdem wurde ein endogener Anstieg dieses Substrates während oxidativem zellulären Stress beobachtet (Lee et al., 2004; Rainier et al., 2004). Demzufolge könnten Toxine und Stress in Kombination mit einer gestörten MR-1 Aktivität bei dieser Dystonieform zu einer Verschlimmerung neuronaler Toxizität führen (Breakfield et al., 2008).

Darüber hinaus werden Sonderformen dystoner Störungen unterschieden, die weder den Kriterien der primären noch der sekundären Dystonien eindeutig zuzuordnen sind. Zu diesen Sonderformen werden neben den zuvor beschriebenen paroxysmalen Dystonien die Dystonie-Plus-Syndrome sowie die heredodegenerative Dystonien gezählt.

Bei den Dystonie-Plus-Syndromen treten neben den dystonen Symptomen zusätzlich weitere Bewegungsanomalien wie z.B. Parkinsonismus oder Myoklonus auf, die nicht sekundär auf andere Erkrankungen zurückzuführen sind. Auch bei dieser Dystonieform gibt

28

es keinerlei Hinweise auf neuropathologische Veränderungen (Fahn *et al.,* 1998). Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe stellen hierbei die Dopa-responsive Dystonie (DYT 5a, 5b, DYT 14), die Myoklonusdystonie (DYT 11, DYT 15) und das Dystonie-Parkinson-Syndrom mit plötzlich einsetzendem Beginn (DYT 12) dar.

Heredodegenerative Dystonien stellen eine große Gruppe meist seltener neurodegenerativer Erkrankungen dar, bei denen die Dystonie manchmal ein prominentes Symptom ist, aber meist andere neurologische Symptome im Vordergrund stehen wie beispielsweise bei der Kupferspeicherkrankheit Morbus Wilson (Kamm, 2009).

2.3.3. Pathophysiologie primärer Dystonien

Die verschiedenen der Erkrankung zugrundeliegenden Gendefekte (s. Tab. 1) sowie die variable Ansprechbarkeit auf diverse Pharmaka deuten darauf hin, dass die Pathogenese der unterschiedlichen Dystonieformen wahrscheinlich heterogen ist. Trotz dieser ätiologischen Heterogenität sprechen die Ähnlichkeiten der klinischen Krankheitsbilder für einen gemeinsamen Mechanismus. Verschiedene Studien mit Bildgebungsverfahren wie beispielsweise der Magnetresonanztomographie (MRI) haben bei Patienten mit primären und sekundären Dystonien bemerkenswert ähnliche sensomotorische Abnormalitäten gezeigt. Diese pathophysiologischen Gemeinsamkeiten spiegeln sich in einer volumetrischen Ausweitung der Basalganglien, einer erhöhten Dichte der grauen Substanz im primären sensorischen Kortex, abnormalen Aktivitäten im sensomotorischen Kortex, im supplementärmotorischen Areal und im prämotorischen Kortex während motorischer Aufgaben wider (Breakefield et al., 2008; Draganski et al., 2003; Defazio et al., 2007). Mit Hilfe der transkraniellen Magnetstimulation (TMS) wurde außerdem eine erhöhte Erregbarkeit des primären motorischen Kortex bei Dystoniepatienten festgestellt, die vermutlich auf eine mangelnde kortikale Hemmung zurückzuführen ist (Ikoma et al., 1996). Auch Veränderungen der synaptischen Plastizität scheinen einen wichtigen Faktor in der Pathophysiologie der Dystonie darzustellen. So berichten die meisten Patienten, die an übungsspezifischen Dystonieformen wie beispielsweise dem Schreibkrampf oder der Musiker-Dystonie leiden, von einer dem Auftreten dystoner Symptome vorangehenden Überanstrengung der betroffenen Körperregion (Quartarone et al., 2006). Bei diesen Patienten konnte mittels TMS eine Desorganisation der Somatotopie im somatosensorischen als auch den motorischen Kortices und den Basalganglien festgestellt werden (Lenz et al., 1998; Vitek et al., 1999; Quartarone et al., 2008; Delmaire et al., 2009; Tamura et al., 2009). Die Tatsache, dass die Latenzzeit zwischen dem auslösenden Ereignis und dem ersten Auftreten der Erkrankung häufig Monate bis Jahre beträgt, unterstützt die Hypothese einer abweichenden Neuroplastizität im Striatum und/oder dem Neokortex (Byl et al., 1996; Quartarone et al., 2003; Peterson et al., 2010). Neuropathologische post mortem Studien an Gehirnen von

Patienten idiopathischer Dystonie mit ergaben keinerlei Anzeichen für eine Neurodegeneration in Form einer Atrophie, einem Neuronenschwund oder entzündlichen Prozessen. Da sekundäre Dystonien hingegen häufig mit Läsionen im Putamen oder dem Globus pallidus assoziiert sind (Bhatia und Marsden, 1994; Marsden und Quinn, 1990), wird vermutet, dass auch den idiopathischen Formen Funktionsstörungen innerhalb der Basalganglien ursächlich sind. Die klinische Assoziation dystoner Symptome mit anderen Erkrankungen, die zu Bewegungsstörungen führen, deutet ebenfalls auf eine Beteiligung der Dystoniegeschehen Dystonien Basalganglien am hin. So werden häufig als Begleiterscheinung des idiopathischen Morbus Parkinson sowie einiger Parkinson-Plus-Syndrome beobachtet (Jankovic und Tintner, 2001; Rivest et al., 1990; Schneider et al., 2009; Tolosa und Compta, 2006), deren Pathologie in erster Linie auf Fehlfunktionen des dopaminergen, aber auch anderen innerhalb der Basalganglien angesiedelten Neurotransmittersystemen beruht (Perlmutter und Mink, 2004; Schneider et al., 2009). Des Weiteren wurden die Basalganglien auf Basis von neurochirurgischen Interventionen mit Dystonien in Zusammenhang gebracht. Hierbei zeigte sich, dass bei Dystoniepatienten infolge der thermolytischen Läsion des GPi dystone Symptome verbessert werden können (Gross, 2008; Marks, 2007). Eine stützende Begründung hierfür findet sich zudem in diversen Tiermodellen, bei denen durch die Manipulation striataler Strukturen dystone Bewegungsstörungen auftraten bzw. induzierbar waren (z.B. Gernert et al., 2002; Tabbal et al.. 2006: Cunv et al., 2008). Zwar werden Dystonien heute daher als Basalganglienerkrankung angesehen (s. Kap. 2.2.2.), allerdings gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass viele weitere Gehirnregionen zur Manifestation der Dystonie beitragen können wie beispielsweise Kortex, Cerebellum, Thalamus und Mittelhirn sowie Hirnstamm (Neychev et al., 2011). Daher wird heute auch von einer "Network"-Erkrankung gesprochen (Neychev et al., 2011). Dies zeigt, dass die Pathophysiologie der primären Dystonien bis heute immer noch weitestgehend unbekannt ist. Eine allen Dystonien gemeinsame biochemische Funktionsstörung konnte bislang ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Es gibt jedoch zahlreiche Befunde die auf eine Fehlfunktion der dopaminergen Neurotransmission im Dystoniegeschehen hindeuten (Augood et al., 2002, 2004; Casey, 2004; Perlmutter und Mink, 2004). Zum Beispiel sind dystone Bewegungsstörungen ein besonderes Merkmal der Dopa-responsiven Dystonie, einer Erkrankung, bei der die Patienten einen genetischen Defekt der Dopamin-Biosynthese, verursacht durch eine verminderte Aktivität der GTP-Cyclohydrolase, aufweisen (Ichinose et al., 1994; Nagatsu und Ichinose, 1997; Nygaard, 1995; Patel et al., 1995). Weiterhin können dystone Symptome, wie bereits beschrieben, mit anderen Dopamin-assoziierten Erkrankungen und Therapieformen wie beispielsweise im Falle des Morbus Parkinson einhergehen oder als akute bzw. chronische Komplikationen infolge einer Behandlung mit Dopaminrezeptor-Blockern, welche bei psychischen oder

gastrointestinalen Erkrankungen angewendet werden, in Erscheinung treten (z.B. Burke et al., 1982; Bateman et al., 1985; Burke et al., 1985; Rupniak et al., 1986; Kang et al., 1988; Factor und Matthews, 1991; Casey, 2004; Pinninti et al., 2006). Im Rahmen von PET Studien wurden darüber hinaus eine verringerte Dichte an striatalen Dopaminrezeptoren sowie eine veränderte Dopamin-Aufnahme festgestellt (Playford et al., 1993; Perlmutter et al., 1997 a, b; Naumann et al., 1998). Die Funktionsstörung der dopaminergen Neurotransmission gilt daher als ein gemeinsames Merkmal mehrerer, aber nicht aller Dystonien, deren Manipulation eine attraktive Strategie zur Behandlung einer Gruppe von Dystonieformen ergibt (Jinnah et al., 2008). Allerdings bleibt festzuhalten, dass sich bisherige neurochemische Untersuchungen auch vorwiegend auf das dopaminerge System beschränkten. Dabei könnten die dopaminergen Fehlfunktionen lediglich eine Folge von Störungen in anderen Neurotransmittersystemen sein, wie beispielsweise einer verminderten GABAergen Inhibition (Richter, 2005), wofür auch vereinzelte Befunde bei Dystoniepatienten sprechen (Levy und Hallett, 2002). Obwohl Anticholinergika heutzutage die gebräuchlichste und effektivste medikamentöse Therapie bei Patienten mit primären generalisierten Dystonien darstellen, mangelt es an Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung des cholinergen Systems, das innerhalb der Basalganglien eng mit der dopaminergen Neurotransmission interagiert (s. Kap. 2.2.2.).

2.3.3.1. Bedeutung des TorsinA für die Early-onset-TD

TorsinA (TA) ist ein 332 Aminosäuren langes Protein, das aufgrund seiner Sequenzhomologie der AAA⁺- (<u>A</u>TPase <u>a</u>ssoziiert mit einer Vielzahl an zellulären <u>A</u>ktivitäten) Superfamilie molekularer Chaperone zugeordnet wird (Neuwald et al., 1999). Diese Proteine sind charakteristischerweise in Form von oligomeren Komplexen angeordnet und führen innerhalb ihrer Zielproteine zu Konformationsänderungen (Ozelius et al., 1997, 1998). Sie sind an zahlreichen zellulären Funktionen beteiligt, die neben der Faltung und Degradation anderer Proteine, die dynamische Regulierung des Zytoskeletts, den Membrantransfer und die Vesikelfusion einschließen (Vale, 2000). TorsinA wird vom DYT1-Gen (auch als TOR1A bezeichnet) codiert und wird im Nervensystem, aber auch anderen Geweben ubiquitär exprimiert (Ozelius et al., 1997). Im ZNS des Menschen wurde es in besonders hohen Konzentrationen in dopaminergen Neuronen des SNc sowie cholinergen Interneuronen des Striatums detektiert, was die Hypothese einer TA-Funktion innerhalb der Basalganglien unterstützt. Aber auch im cerebralen Kortex, Thalamus, Hippocampus, Cerebellum, Mittelhirn, Pons sowie dem Rückenmark wurden hohe Konzentrationen des Proteins nachgewiesen (Augood et al., 1998, 1999; Shashidharan et al., 2000a, 2000b; Konakova et al., 2001; Rostasy et al., 2003; Oberlin et al., 2004). Auf subzellulärer Ebene ist das Wildtyp-TA hauptsächlich im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) sowie dem

angrenzenden perinukleären Raum der Kernmembran lokalisiert, während das mutierte Protein meist mit der Kernmembran assoziiert vorliegt (Naismith et al., 2004; Goodchild und Dauer, 2004; Hewett et al., 2006). Obwohl die meisten neuropathologischen Untersuchungen am Menschen keine Anzeichen einer Neurodegeneration bei der DYT1-Dystonie zeigten, wurden in einer post mortem Studie an vier Gehirnen betroffener DYT1-Patienten geringfügig vergrößerte Zellkörper dopaminerger Neurone (Rostasy et al., 2003) sowie perinukleäre Ubiquitin-positive Einschlüsse im Bereich des Mittelhirns (McNaught et al., 2004) nachgewiesen. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung haben Untersuchungen an Zellkulturen ergeben, dass eine Überexpression an mutiertem TA (∆E-TA) zur Bildung großer perinukleärer Einschlusskörperchen führt, die sowohl für ∆E-TA, Ubiquitin, als auch nukleäre Marker wie Lamin A/C und B positiv sind (Gonzalez-Alegre und Paulson, 2004; Hewett et al., 2000; Kustedjo et al., 2003; Misbahuddin et al., 2005). So wird vermutet, dass diese membranären Einschlüsse der Kernmembran entstammen, in der das ∆E-TA akkumuliert. Das Vorkommen membranärer Einschlüsse wurde darüber hinaus auch im Rahmen von *in-vivo* Untersuchungen in verschiedenen DYT1-Tiermodellen bestätigt (s. Kap. 2.4.2.).

Über die physiologische Bedeutung des TA sowie den Zusammenhang zwischen dem identifizierten molekulargenetischen Defekt und der daraus resultierenden Pathophysiologie der Erkrankung ist bisher wenig bekannt. Basierend auf verschiedenen Studien wird angenommen, dass TA für die Regelung der Organisation der Kernmembran (Goodchild und Dauer, 2004; Naismith et al., 2004) und des ER (Hewett et al., 2000, 2003; Kustedjo et al., 2003) aber auch für den Sekretionsweg (Hewett et al., 2007, 2008; Torres et al., 2004) und das Recycling synaptischer Vesikel (Granata et al., 2008) eine wichtige Rolle spielt. So wurde TA in mehreren subzellulären Kompartimenten nachgewiesen, wo es mit zahlreichen Bindungspartnern mit unterschiedlichen Funktionen interagiert, wie beispielsweise dem zytoplasmatischen Motorprotein KLC1 sowie Zytoskelett-assoziierten Proteinen wie Vimentin und Actin (Kamm et al., 2004; Hewett et al., 2006). Diese Proteine spielen für die Motilität des Zytoskeletts, die Chemotaxis und Adhäsion, aber auch für die intrazelluläre Signalweiterleitung sowie die Neuritenausreifung eine wichtige Rolle. TA interagiert weiterhin mit Komponenten der Kernmembran wie dem LAP1 und Nesprin-3 sowie transmembranären Proteinen im ER wie LULL1 und Printor (Goodchild und Dauer, 2005; Nery et al., 2008; Giles et al., 2009) und SNAP (SNARE-assoziiertes Protein) auf sekretorischen Granula (Densecore granules) (Granata, 2008). Eine andere Hypothese zur Funktion des TA basiert auf seiner Homologie zu den Heat-shock Chaperonen und führt zu der Annahme, dass TA an der zellulären Stressantwort beteiligt ist. So wurde in einer Studie an Mäusen, denen MPTP, ein neurodegenartives Toxin, das oxidativen Stress verursacht, verabreicht wurde, gezeigt, dass die Expression des TorsinA steigt (Kuner et al., 2004).

Obwohl die molekularen Mechanismen der TA-Fehlfunktion noch nicht vollständig aufgeklärt sind, ist es denkbar, dass das mutierte TA eine Sensibilisierung gegenüber Stressoren des ER induziert. Ein daraus resultierender abnormaler Proteintransport würde funktionelle Folgen bezüglich der Neurotransmission nach sich ziehen, wie beispielsweise Veränderungen in der Anzahl verschiedener Transporter, Rezeptoren und akzessorischer Proteine und somit tiefgreifende Auswirkungen auf die synaptische Aktivität haben (Bragg et al., 2011). Aufgrund der Homologie zu AAA⁺-ATPasen wird außerdem angenommen, dass es sich bei der aktiven Form des TA ebenfalls um einen oligomerischen Komplex handelt (Neuwald et al., 1999; Breakefield et al., 2001). Die ∆E-Deletion könnte daher die Bildung dieses Komplexes und somit die Interaktion des TA mit seinen multiplen Bindungspartnern stören, was eine Funktionsverlust-Mutation zur Folge hätte, die wiederum dystone Symptome hervorrufen könnte. Alternativ wäre es möglich, dass das mutierte TA das Wildtyp-Protein bindet und zu einer Fehllokalisation des TA und seinen interagierenden Proteinen in die Kernmembran die charakteristischen und perinukleären Einschlusskörperchen führt (Hewett et al., 2000; Goodchild und Dauer, 2005; Goodchild et al., 2005; Misbahuddin et al., 2005), was zumindest eine molekulare Erklärung für den dominant-negativen Charakter des mutierten Proteins liefern könnte. Darüber hinaus wurde TA wie bereits beschrieben nicht nur in dopaminergen Neuronen der SNc sondern auch in TANs im Striatum sowie cholinergen Interneuronen des PPN nachgewiesen (Augood et al., 1999; Shahed und Jankovic, 2007). Daher wäre es denkbar, dass Abweichungen in der TA-Funktion sowohl die intrinsischen als auch extrinsischen cholinergen Einflüsse auf das Striatum nachteilig beeinträchtigen könnten (Peterson et al., 2010).

2.3.4. Therapie der primären Dystonien

Durch das Fehlen eines einheitlichen pathophysiologischen Grundkonzeptes ist eine gezielte Therapie primärer Dystonien bislang nicht möglich. Erschwert wird die Suche nach den zugrundeliegenden Mechanismen dadurch, dass die Pathophysiologie für verschiedene Formen der Dystonie, wie bereits beschrieben, vermutlich heterogen ist. Die daher meist nur symptomatisch und empirisch durchgeführten Therapiemaßnahmen sind oft unbefriedigend oder gar unwirksam, so dass die Erkrankung häufig zu schweren Behinderungen führt.

2.3.4.1. Medikamentöse Therapien

Bei primären Dystonien ist lediglich die Dopa-responsive Dystonie (DRD) einer ursächlichen Therapie zugänglich. Dieser Dystonieform liegt eine Störung des Dopaminstoffwechsels zugrunde, die mit L-Dopa, einem Vorläufer in der Dopaminsynthese, erfolgreich behandelt werden kann (Leitlinien der DGN, 2008). Da auch einige sekundäre Dystonieformen in geringem Maße auf L-Dopa ansprechen, sollte bei allen Dystonien mit Beginn im Kindesoder Jugendalter ein Therapieversuch mit L-Dopa am Anfang der Behandlung stehen. Allerdings kann die Behandlung mit L-Dopa bei etwa 34% der Patienten mit anderen primären Dystonieformen auch zu einer Verschlechterung der Symptomatik führen (Spinella und Sheridan, 1994). Antidopaminerge Substanzen wie beispielsweise Tetrabenazin finden ebenfalls Anwendung in der Behandlung verschiedener Dystonieformen, ihr therapeutischer Einsatz ist allerdings aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen (tardive Dystonie, Parkinson) stark limitiert (Jinnah und Hess, 2008).

Die meisten Erfahrungen zur medikamentösen Behandlung segmentaler und generalisierter Dystonien wurden durch den Einsatz anticholinerger Substanzen, insbesondere dem Trihexyphenidyl, gewonnen (Burke *et al.*, 1986; Brans *et al.*, 1996; Bressman und Greene, 2000). Mittels einer prospektiven doppelblinden Studie konnten positive Effekte auf die Ausprägung der generalisierten TD nachgewiesen werden (Burke *et al.*, 1986). Diese Form der Therapie wird bei einschleichender Dosierung v.a. von jungen Patienten gut vertragen, die Medikamente müssen jedoch über einen langen Zeitraum eingenommen werden bevor sie ihre effektive Wirkung entfalten. Durch die häufig benötigten hohen Dosierungen kommt es zudem zu einer Vielzahl an schwerwiegenden Nebenwirkungen, wodurch ihre praktische Anwendung stark eingeschränkt ist. Anticholinergika werden auch zur Therapie fokaler Dystonien eingesetzt, die Effekte sind jedoch schwächer und einer Behandlung mit Botulinumtoxin unterlegen.

Die Therapie generalisierter Dystonien wird häufig durch die Gabe von Muskelrelaxantien wie Benzodiazepinen, Tizaniden, Cyclobenzaprinen und Baclofen ergänzt (Jankovic, 2009). Wie bereits erwähnt, zeigen Antikonvulsiva wie Carbamazin und Phenytoin eine gute Wirksamkeit bei der Behandlung der paroxysmale kinesiogene Dystonien (Bruno *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2009), jedoch nicht bei anderen Dystonieformen. Bei der weniger gut therapierbaren paroxysmalen nicht kinesiogenen Form hingegen werden Therapieversuche mit Clonazepam und Azetazolamiden empfohlen.

Die selektive periphere Denervierung mittels Botulinumtoxin gilt nach den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie als Mittel der Wahl zur Behandlung fokaler Dystonien (Leitlinien der DGN, 2008). Es wird v.a. bei der Behandlung von Blepharospasmen und zervikalen Dystonien eingesetzt, aber auch lokale Injektionen in besonders stark betroffene Muskeln bei generalisierten Dystonien bringen gewisse Erfolge. Botulinumtoxin A ist das Exotoxin von Clostridium botulinum. Es blockiert die Freisetzung des Acetylcholin an der neuromuskulären Endplatte und führt somit zu einer temporären lokalen Chemodenervation sowie einer daraus resultierender Muskelschwäche, welche die übersteigerte Aktivität dystoner Muskeln reduziert (Ozelius *et al.*, 2011). Zusätzlich zu diesem peripheren Effekt, könnte das Toxin die Pathophysiologie im ZNS über eine

Literaturübersicht

Reduktion der afferenten Rückmeldung vom Muskel verbessern (Curra *et al.*, 2004). Innerhalb weniger Wochen nach Botulinum-Applikation kommt es zu einer polyneuralen Reinnervation der Muskelfasern und schließlich einer funktionellen Restitution der neuromuskulären Synapse, weshalb die Behandlung nur etwa drei Monate wirksam ist. Die Verwendung sehr hoher Dosen und kurzfristige Reinjektionen erhöhen bei einigen Patienten das Risiko einer Therapieresistenz durch die Entwicklung von Antikörpern (Ak) gegen Botulinumtoxin A (Leitlinien der DGN, 2008; Adler *et al.*, 2002). Therapeutisch ist in diesen Fällen ein Wechsel auf Botulinum Toxin B möglich (Lew *et al.*, 2000). Die Entwicklung einer neueren Formulierung von nur 5 ng des Neurotoxins vom Typ A 100 Einheiten (ursprünglich 25 ng/100 Einheiten) scheint ein wesentlicher Faktor in der Verbesserung der Toleranzentwicklung zu sein (Jankovic *et al.*, 2003). Dennoch entwickeln 1-2% der über vier Jahre behandelten Patienten eine Immunität (Jankovic *et al.*, 2003; Jankovic, 2006; Brin *et al.*, 2008).

2.3.4.2. Operative Therapien

Bei schweren segmentalen oder generalisierten Dystonien, die auf eine medikamentöse Behandlung nicht ansprechen und so zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität führen, sind chirurgische Eingriffe als Alternativtherapien in Betracht zu ziehen. Hierbei finden peripher denervierende Methoden, die intrathekale Baclofengabe sowie stereotaktische Verfahren Anwendung (Leitlinien der DGN, 2008).

Vor der Anwendung des Botulinumtoxin zur Behandlung fokaler Dystonien wurde häufig eine periphere Denervierung durchgeführt, bei der die motorischen Nervenäste betroffener Muskeln operativ durchtrennt wurden. Aufgrund der schwerwiegenden Komplikationen dieses Eingriffs, wird dieses Verfahren heutzutage den Patienten vorbehalten, die gegen Botulinumtoxin resistent sind (Betrand, 1993; Münchau *et al.*, 2001).

Die intrathekale Baclofentherapie mittels Dauerinfusionspumpe findet v.a. bei Patienten mit schweren Formen axialer und generalisierter Dystonien Einsatz und dient als Behandlungsmaßnahme mit palliativem Charakter hauptsächlich zur Linderung der Schmerzsymptomatik (Schmidt *et al.*, 2008).

Während in der Vergangenheit vorwiegend stereotaktische Pallidotomien und Thalamotomien vorgenommen wurden, tritt heutzutage das Verfahren der tiefen Hirnstimulation (DBS = deep brain stimulation) als zunehmend Erfolg versprechende Therapie in den Vordergrund. Aufgrund des guten Ansprechens dystoner Symptome bei der Parkinson-Krankheit nach Eingriffen im internen Pallidum und der zentralen Rolle dieses Kerngebietes in den derzeitigen pathophysiologischen Modellen von Basalganglienerkrankungen wird heute der GPi als Zielgebiet stereotaktischer Operationen bei Dystonien bevorzugt (Leitlinien der DGN, 2008). Man vermutet dabei, dass durch die hochfrequente Reizung über chronisch implantierte Hirnelektroden die gestörten Signale aus den Basalganglien aufgehoben und die Ausgangssignale zum Thalamus daraufhin reguliert werden (Breakefield *et al.*, 2008). Die Wirkung der tiefen Hirnstimulation im Globus pallidum unterstützt die heutige Hypothese einer kritischen Involvierung der Basalganglien in die Pathophysiologie der Dystonie (s. Kapitel 2.3.3.). Damit ist allerdings nicht der Ursprungsort für die Störung aufgeklärt. Die variable Effektivität der tiefen Hirnstimulation in den verschiedenen Formen primärer und sekundärer Dystonien weist auf pathophysiologische Unterschiede bei Dystonien hin (Breakefield *et al.*, 2008).

In Anbetracht der klinischen Heterogenität dystoner Bewegungsstörungen und der eingeschränkten Untersuchungsmethoden, ist eine ausreichende Zahl an Patienten mit homogenem Krankheitsbild für Untersuchungen meist nicht gegeben. Deshalb können gut etablierte Tiermodelle einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese und damit zur Entwicklung geeigneter rationaler Therapiemaßnahmen dystoner Bewegungsstörungen leisten, da verschiedene invasive Methoden wie Neuroläsionen, Mikroinjektionen etc. experimentell angewendet werden können, die bei Dystoniepatienten nicht durchführbar sind (Richter und Löscher, 1998).

2.4. Tiermodelle für primäre Dystonien

Wie in 2.3.3. erläutert, die Dystonie zugrundeliegenden Kapitel sind der pathophysiologischen Mechanismen bisher noch weitestgehend ungeklärt, so dass eine gezielte Therapie dieser Erkrankung bis heute nicht möglich ist. Gut etablierte Tiermodelle könnten zur Aufklärung der Pathophysiologie dystoner Bewegungsstörungen und damit zur Entwicklung von effizienten, rationalen Therapiemaßnahmen beitragen. Aufgrund der Heterogenität dieser Erkrankung müssen solche Tiermodelle allerdings vor ihrer Verwendung als Modell für die Dystonie genau charakterisiert werden und für eine bestimmte Dystonieform klar definiert sein (Richter und Löscher, 2000). Dabei sollten sie v.a. auf die beiden Parameter Verlässlichkeit (engl.: reliability) und Gültigkeit (engl.: validity) überprüft werden. Die Verlässlichkeit eines Tiermodells bezieht sich auf die Beständigkeit, mit der sich ein bestimmtes Phänomen immer wieder hervorrufen lässt. Wohingegen die Gültigkeit Bezug nimmt auf die Eigenschaft eines Modells, ein besonderes Charakteristikum der Krankheit zu reproduzieren. Dabei wird weiter unterschieden in:

- 1. "face validity" (gleiche Symptomatik wie bei der menschlichen Erkrankung)
- 2. "predictive validity" (Ansprechen auf die gleichen Therapiemaßnahmen wie der Mensch)
- 3. "constructive validity" (vergleichbare pathophysiologische Mechanismen) (Jinnah *et al.*, 2005).

36

In Bezug auf die idiopathischen Dystonie gestaltet sich die Beurteilung der "constructive validity" eines Tiermodells allerdings schwierig, da die der Erkrankung zugrundeliegenden Mechanismen bislang weitestgehend ungeklärt sind.

2.4.1. Phänotypische Tiermodelle

Phänotypische Dystoniemodelle sind Tiermodelle, die spezifische Symptome der Dystonie zeigen (z.B. motorische Störungen), die denen der menschlichen Erkrankung ähnlich sind. Ob hierbei ein ätiologischer Zusammenhang besteht, ist jedoch häufig ungeklärt (Jinnah et al., 2005). Grundsätzlich unterscheidet man genetische Modelle, die durch Spontanmutation entstanden sind, von Modellen, bei denen eine Dystonie experimentell induziert wurde (Richter und Löscher, 2000). So ist es beispielsweise möglich, mittels intracerebraler Mikroinjektionen Kainat, Glutamatrezeptor-Agonisten, von einem dystone Bewegungsstörungen bei Mäusen und Ratten auszulösen (Raike et al., 2005). Solche experimentell induzierten Tiermodelle eignen sich allerdings weitaus weniger für die Erforschung der Pathophysiologie sowie neuer Therapiemöglichkeiten für idiopathische Dystonien, als phänotypische Tiermodelle mit genetischem Hintergrund (Richter und Löscher, 2000). Bei den Letztgenannten werden die dystonen Bewegungsstörungen vererbt, der genetische Hintergrund ist jedoch häufig nicht genau bekannt bzw. stimmt nicht mit demjenigen von Dystoniepatienten überein. In den letzten Jahren wurden verschiedene Tiermodelle beschrieben (Jinnah et al., 2008), die gut charakterisiert sind.

Die dt-Maus ("dystonia musculorum mouse") geht aus einer Spontanmutation innerhalb einer BALB/cBy-Mauslinie hervor. Diese Mäuse besitzen einen Gendefekt auf Chromosom 1, dem ein autosomal-rezessiver Erbgang zugrundeliegt. Im Alter von zwei Wochen zeigen homozygote Tiere erste Symptome in Form einer Hyperflexion der Hinterextremitäten sowie einer Hyperpronation der Pfoten. Aufgrund der rapiden Progression dieser Erkrankung entwickeln die Tiere im Alter von 3-4 Wochen schwere Ataxien, Hyperextensionen und Hyperflexionen der Gliedmaßen sowie abnorme Verdrehungen des Rumpfes. Die körperlichen Beeinträchtigungen sind dabei so schwerwiegend, dass die Tiere nicht mehr in der Lage sind ausreichend Wasser und Futter aufzunehmen und daher meist innerhalb nur weniger Wochen sterben (Duchen et al., 1964). Eine Zucht mit homozygoten Mäusen ist aus diesem Grund nicht möglich. Mittels licht- bzw. elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnten axonale Schwellungen im Hirnstamm und Rückenmark sowie eine segmentale Demyelinisierung peripherer Nerven nachgewiesen werden (Duchen et al., 1964; Sotelo und Guenet, 1988). Diese Veränderungen scheinen auf dem Defektgen der dt-Maus zu beruhen, welches für das zytoskelletale Linkerprotein Dystonin/Bpag1 kodiert, das für die Aufrechterhaltung der Zellarchitektur von Neuronen, den vesikulären Transport innerhalb der

Axone und der Struktur des "nuclear envelope" wichtig zu sein scheint, ähnlich der Funktion des TA (De Repentigny *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Young und Kothary, 2008). Aufgrund der genannten neuropathologischen Veränderungen im peripheren Nervensystem wird die *dt*-Maus nicht mehr als Dystoniemodell angesehen.

Die dt-Ratte entstand durch eine Spontanmutation innerhalb einer Sprague-Dawley-Zuchtlinie und diente ursprünglich als Tiermodell für die primäre generalisierte Dystonie. Mutationen innerhalb des für die DYT1-Dystonie codierenden Gens konnten jedoch ausgeschlossen werden (Ziefer et al., 2002). Der Erbgang ist autosomal-rezessiv und weist eine sehr hohe Penetranz auf. Im Alter von etwa 12 Tagen entwickeln die Tiere erste dystone Symptome, die sich beispielsweise in einem Torticollis oder Kreisbewegungen äußern (Lorden et al., 1984) und in Ruhe- bzw. Schlafphasen wieder verschwinden. Dystone Ratten weisen neben axialen auch appendikuläre Dystonien auf, die ohne chirurgische Intervention aufgrund des progressiven Charakters innerhalb kürzester Zeit generalisieren und zu schraubenartigen Bewegungen der Gliedmaßen und des Rumpfes führen. Die daraus resultierenden motorischen Beeinträchtigungen sind so gravierend, dass die Tiere ohne unterstützende Maßnahmen (Sondenfütterung, etc.) noch vor Erreichen der Geschlechtsreife sterben. Daher kann die Zucht nur mit heterozygoten Tieren erfolgen (Richter und Löscher, 2000). Während lichtmikroskopisch keine Veränderungen im peripheren oder zentralen Nervensystem festgestellt werden konnten (Lorden et al., 1984; LeDoux et al., 1995), zeigten neurochemische Untersuchungen, dass nicht den Basalganglien, sondern vielmehr dem Kleinhirn eine ausschlaggebende Rolle für die Manifestation des motorischen Phänotyps bei der dt-Ratte zukommt. Mittels elektrophysiologischer Studien konnte zudem eine erhöhte Entladungsrate tiefgelegener Kleinhirnkerne nachgewiesen werden (LeDoux et al., 1998). Um die Hypothese einer kritischen Involvierung des Kleinhirns zu überprüfen, wurden bei diesen Ratten Cerebellektomien durchgeführt, die interessanterweise zu einem vollständigen Verschwinden der dystonen Symptome führten (LeDoux et al., 1998). Obwohl Kleinhirnläsionen eher selten bei Patienten mit symptomatischen Dystonien beschrieben werden, ist eine Beteiligung cerebellärer Störungen an der Entstehung dystoner Bewegungsstörungen nicht auszuschließen.

2.4.1.1. Der dt^{sz}-Hamster

Der *dt^{sz}*-Hamster ging durch eine Punktmutation aus einer Inzuchtlinie (BIO 86.93) Syrischer Goldhamster (Mesocricetus auratus auratus) hervor und wurde aufgrund seiner generalisierten dystonen und choreoathetotischen Bewegungsstörungen ursprünglich als ein Modell für die Reflexepilepsie vorgeschlagen (Yoon *et al.,* 1976). Daher erhielt die Hamstermutante zunächst das Gensymbol *sz* (*sz* für engl.: seizures, Anfälle). Durch

Einkreuzen einer Lakeview-Inzuchtlinie (Prof. W. B. Iturrian, University of Georgia, Athens, Sublinie (UGA 700), USA) entstand eine welche sich durch verbesserte Fortpflanzungsfähigkeit und eine einheitlichere Ausprägung der Bewegungsstörungen auszeichnete (Fisher, 1986). Diese Bewegungsstörungen werden durch ein autosomalrezessiv vererbtes Gen verursacht, welches bisher noch nicht identifiziert werden konnte (Richter, 2005). Eingehende Untersuchungen im Rahmen der Evaluierung dieses Tiermodells ergaben schließlich, dass es sich bei den zuvor beobachteten episodisch auftretenden motorischen Störungen nicht wie anfangs angenommen um eine Epilepsie handelt, sondern dass die Mutante vielmehr Merkmale einer PNKD, kurz paroxysmale Dystonie genannt (s. Kap. 2.3.2.2.), aufweist. Ergänzend wurde daher das Symbol dt für dyston (engl.: dystonic) eingeführt (Löscher et al., 1989). Der dt^{s_2} -Hamster gilt heute als einziges gut etabliertes und anerkanntes phänotypisches Tiermodell für eine paroxysmale Dystonie (Nardocci et al., 2002; Richter, 2005; Jinnah et al., 2008).

2.4.1.1.1. Klinisches Erscheinungsbild

Dystone Episoden sind bei der *dt^{sz}*-Hamstermutante bereits durch milden Stress induzierbar. Sie treten in Form schraubenartiger Verdrehungen des Rumpfes und der Gliedmaßen auf, wobei jeder Hamster seinen individuell maximalen Schweregrad meist innerhalb von drei Stunden nach Stress-Induktion erreicht. Diese dystonen Bewegungsstörungen können über einen Zeitraum von 2-5 Stunden anhalten bis sich das Tier wieder vollständig davon erholt (Löscher et al., 1989). Da das Fortschreiten der dystonen Symptome durch Schlaf gemindert wird (Richter, 2005), müssen die Hamster während der Untersuchungen mit Hilfe taktiler Stimuli am Einschlafen gehindert werden. Die Dystonie bei den dt^{sz}-Hamstern zeigt einen charakteristischen altersabhängigen Verlauf, bei dem die ersten Symptome etwa ab dem 16. Lebenstag (LT) durch Stress induzierbar sind. Am Tag des Absetzen (21. LT) sowie zwischen dem 30. und 42. LT erreichen die dystonen Episoden dann schwerste Ausprägungen. Danach nimmt der Schweregrad wieder kontinuierlich ab, bis ab ca. dem 70. LT keine dystonen Störungen mehr induzierbar sind (Richter und Löscher, 1998, 2000). Die Beurteilung der Dystonie-Schweregrade erfolgt nach einem etablierten sechs Stadien umfassenden Score-System und erstreckt sich von moderaten Störungen (verzögertes Aufsetzen der gespreizten Vorderpfoten, Stadium 2) bis hin zu einer vorübergehenden Immobilität in generalisierter dystoner Körperhaltung (Stadium 6) (Löscher et al., 1989; s. Punkt 3.2.1.1.). Die Vitalität der Tiere wird durch die episodisch auftretenden Bewegungsstörungen nicht beeinträchtigt. Auch die Fertilität der Hamster ist aufgrund der noch vor Beginn der Zuchtreife eintretenden altersabhängigen Spontanremission dystoner Episoden ungestört, sodass homozygote dystone Tiere miteinander verpaart werden können.

Charakteristika	Patienten	<i>dt^{sz}-</i> Hamster
 Episoden unwillkürlicher Muskelkokontraktionen, die zu drehenden Bewegungen und abnormen Haltungen führen 	+	+
Episoden dauern mehrere Stunden an	+	+
Bewusstsein unverändert	+	+
Auslöser der Episoden: Aufregung, Stress und Koffein	+	+
• EMG-Veränderungen	+	+
Abwesenheit von EEG-Veränderungen	+	+
verminderte Aktivität der Neurone des GPi bzw. EPN	+	+
 keine mittels Standardtechniken pathomorphologisch identifizierbaren ZNS-Veränderungen 	+	+
 antidystone Wirkung GABA-mimetischer Substanzen und Neuroleptika 	+	+

Tab. 2: Charakteristische Merkmale der paroxysmalen non-kinesiogenen Choreoathetose des Menschen, die sich auch beim *dt*^{sz}-Hamster zeigen (nach Richter und Löscher, 1998).

2.4.1.1.2. Befunde zur Neuropathologie sowie zur neuronalen Aktivität bei der dt^{sz}-Mutante

Um die der Dystonie zugrundeliegenden Mechanismen zu identifizieren, wurden zahlreiche neurochemische, immunhistologische und elektrophysiologische Untersuchungen bei dt^{s_2} -Hamstern und nicht dystonen Kontrollhamstern zum Vergleich durchgeführt. Grundsätzlich wurden im ZNS der dt^{sz}-Hamster mittels histologischer Standardverfahren keine morphologischen Abnormalitäten nachgewiesen. Es gab auch keine Anzeichen einer Neurodegeneration oder einer generelle Retardierung der Gehirnentwicklung (Wahnschaffe et al., 1990; Burgunder et al., 1999; Nobrega et al., 1999). Untersuchungen zur neuronalen Aktivität mittels 2-Deoxyglukose-Aufnahme zeigten im dorsomedialen Striatum, in den ventralen Kernen des Thalamus, dem medialen Ncl. vestibularis sowie dem Ncl. ruber eine signifikant erhöhte Aktivität der Synapsen und Axone bei dt^{sz}-Hamstern, während diese in den tiefen cerebellären Ncll. und dem retikulären thalamischen Kern vermindert war (Richter et al., 1998). Zusätzliche histochemische Untersuchungen ergaben, dass die Aktivität der Cytochromoxidase, einem Enzym der mitochondrialen Atmungskette, deren Veränderung ein Zeichen anhaltender Veränderungen des Hirnstoffwechsels ist, in verschiedenen Strukturen der Basalganglien herabgesetzt war (Nobrega et al., 1998). Darüber hinaus wurden signifikante Veränderungen des Transkriptionsfaktors c-fos in der lateralen Habenula, die hauptsächlich Afferenzen aus dem EPN erhält, während dystoner Episoden nachgewiesen (Ebert *et al.*, 1996).

Um diesen Abweichungen weiter nachzugehen, wurden, angefangen mit dem dorsalen Striatum, in-vivo-Einzelzellableitungen an anästhesierten Hamstern durchgeführt. Hierbei wurde eine signifikant erhöhte Entladungsrate (+58%) GABAerger Projektionsneurone festgestellt (Gernert et al., 1999a), die wahrscheinlich auf einen Mangel an striatalen GABAergen Interneuronen bei dtsz-Hamstern zurückgeführt werden kann (Gernert et al., 2000; Hamann et al., 2005; Sander et al., 2006). Im EPN des dt^{sz}-Hamsters (homolog zum GPi beim Primaten) wurde hingegen eine signifikant verminderte Feuerrate GABAerger Neurone (-69%) sowie ein verändertes Entlademuster nachgewiesen, was auf einer erhöhten Inhibition durch striatale Projektionsneurone beruhen könnte. Nach Einsetzen der altersabhängigen Spontanremission dystoner Episoden normalisierten sich diese elektrophysiologischen Veränderungen wieder ebenso wie die Dichte der GABAergen Interneurone (Bennay et al., 2001; Gernert et al., 2002; Hamann et al., 2005, 2007; Sander et al., 2006). Hochfrequente Stimulationen des EPN zeigten eine Verbesserung dystoner Symptome bei der Hamstermutante, was die Relevanz abnormer Ausgangssignale der Basalganglien in der Pathophysiologie von Dystonien unterstützt (Harnack et al., 2004). Im GPe wurde lediglich eine Tendenz zur Erhöhung der neuronalen Aktivität ermittelt und es zeigten sich keine Veränderungen der Spontanaktivität in der SNr (Gernert et al., 1999b).

An Gehirnschnitten von *dt^{sz}*-Hamstern konnte mittels der Doppelpuls-Methode eine verstärkte Langzeit-Potenzierung (engl.: long-term potentiation, verkürzt LTP) während dystoner Episoden nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Erregbarkeit kortikostriataler Synapsen mit einer vermehrten präsynaptischen Freisetzung von Glutamat festgestellt (Köhling *et al.*, 2003), die mit dem Defizit an striatalen inhibitorischen Interneuronen in Verbindung stehen könnte. Es gibt zudem einige Befunde, die dafür sprechen, dass Phasen veränderter dopaminerger Aktivität für die Manifestation dystoner Episoden ebenfalls relevant sind (Hamann und Richter, 2004).



Abb. 7: Schematische Darstellung zur Hypothese der Pathophysiologie von paroxysmalen Dystonien beim *dt*^{sz}-Hamster. Durch die verminderte Anzahl GABAerger Interneurone wird die Aktivität GABAerger striataler Projektionsneurone erhöht, weshalb der GPi vermehrt gehemmt wird. Infolgedessen ist die Hemmung des Thalamus vermindert, was wiederum zu einer verstärkten thalamo-kortikalen Erregung führt. Phasen dopaminerger Überaktivität (unter Stresseinfluss) können die Veränderungen verstärkten und so vermutlich zur Manifestation dystoner Episoden führen. Weitere Erläuterungen s. Abb. 1.

2.4.1.1.3. Neurochemische und neuropharmakologische Befunde beim *dt*^{sz}-Hamster

Im Rahmen eingehender neurochemischer Untersuchungen, die teils mehr als 100 Gehirnregionen und -subregionen einschlossen, wurden die meisten Veränderungen beim dt^{sz} -Hamster im Striatum und in den ventralen Kernen des Thalamus festgestellt (Richter und Löscher, 1998, 2002; Richter, 2005). Es gibt zahlreiche Beweise dafür, dass eine gestörte GABAerge Hemmung sowie eine gesteigerte dopaminerge und glutamaterge Aktivität kritisch in das Dystoniegeschehen des dt^{sz} -Hamsters involviert sind (Richter, 2005).

Pharmakologische Manipulationen des dopaminergen Systems zeigten, dass die systemische Verabreichung von Dopaminrezeptor-Antagonisten wie Haloperidol und Clozapin sowie kombinierte Mikroinjektionen von dopaminergen D_1 - und D_2 -Antagonisten den Schweregrad dystoner Episoden deutlich herabsetzten, wohingegen dopaminerge Agonisten sowie Substanzen, die die dopaminerge Aktivität erhöhen, dystone Episoden verschlimmern (Rehders *et al.*, 2000; Nobrega *et al.*, 1999; Richter und Löscher, 1993, 1998). Diese pharmakologischen Befunde sowie die mittels autoradiographischer Analysen ermittelte Reduktion dopaminerger D_1 - und D_2 -Rezeptoren im dorsalen Striatum des dt^{sz} -Hamsters könnten auf einer Rezeptor-Downregulation infolge einer gesteigerten Dopaminfreisetzung beruhen. Anhand von Mikrodialyse-Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass eine erhöhte Dopaminausschüttung im Striatum des dt^{sz} -Hamsters nicht

dauerhaft, sondern lediglich temporär während einer stressinduzierten dystonen Episode vorliegt. Daher wird vermutet, dass die dopaminerge Überaktivität möglicherweise nur eine Folge einer durch den Mangel von striatalen GABAergen Interneuronen verursachten reduzierten GABAergen Inhibition ist (Hamann und Richter, 2004). Mit der akuten Gabe GABA-potenzierender Wirkstoffe konnten besonders positive Effekte auf die Ausprägung dystoner Symptome erzielt werden, während Wirkstoffe und Verbindungen, die die GABAerge Inhibition stören, dystone Episoden verschlimmerten (Richter und Hamann, 2001; Nardocci et al., 2002; Richter und Löscher, 2002). Weiterführende Untersuchungen an dt^{sz}-Hamstern ergaben zudem einen verminderten striatalen Gehalt an GABA sowie eine reduzierte Expression des GABA synthetisierenden Enzyms Glutamatdecarboxylase (Löscher und Hörstermann, 1992; Burgunder et al., 1999). Dies könnte auf einen Mangel an striatalen GABAergen PV⁺-Interneuronen zurückgeführt werden, zumal diese Veränderungen lediglich während der Ausprägung des maximalen Dystonie-Schweregrades festgestellt werden konnten (Gernert et al., 2000; Hamann et al., 2005; Sander et al., 2006). Ergebnisse intrastriataler Mikroinjektionen von GABA_A-Agonisten sowie Benzodiazepinen bestätigten die Hypothese über die funktionelle Relevanz der Reduktion GABAerger Interneurone für die Manifestation der Dystonie (Hamann und Richter, 2002).

Auch das glutamaterge System scheint wesentlich an der Pathogenese der Dystonie beteiligt zu sein (Richter und Löscher, 1998, 2002). So zeigten NMDA- und AMPA-Rezeptor-Antagonisten ebenfalls eine antidystone Wirkung beim *dt*^{sz}-Hamster (Richter und Löscher, 1998), welche auch durch intrastriatal applizierte AMPA-Antagonisten sowie einer Kombination aus AMPA- und NMDA-Rezeptor-Antagonisten partiell bestätigt wurde (Sander, 2004). Des Weiteren wurde eine verminderte Dichte an NMDA-Rezeptoren im ventrolateralen Thalamus sowie eine Reduktion von AMPA-Rezeptoren v. a. im Striatum während dystoner Episoden nachgewiesen (Nobrega *et al.*, 1997, 2002). Die Dichte NOS⁺-Interneurone war im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie beim *dt*^{sz}-Hamster ebenfalls signifikant reduziert (-21%) (Sander, 2004).

Das cholinerge System ist bei der Hamstermutante bislang weniger gut untersucht. Frühere pharmakologische Untersuchungen, die das cholinerge System betreffen, haben gezeigt, dass durch die akute Gabe von Anticholinergika wie Trihexyphenidyl die Latenzzeit bis zum Auftreten erster eindeutiger dystoner Symptome bei dt^{sz} -Hamstern verzögert werden kann (Löscher und Fredow, 1992). Im Gegensatz zu GABAergen Neuronen ist die Dichte cholinerger Interneurone im Striatum bei dystonen Hamstern nicht signifikant vermindert. Mittels quantitativer autoradiographischer Untersuchungen mit einem nicht-selektiven AChR-Liganden wurden keine Veränderungen bei dt^{sz} -Hamstern festgestellt (Hamann *et al.*, 2006). Dies schließt Veränderungen in der Funktion einzelner Rezeptorsubtypen jedoch nicht aus. Eine temporäre striatale dopaminerge Überaktivität während dystoner Symptome (s. oben)

könnte auch Veränderung in der cholinergen Neurotransmission nach sich ziehen und umgekehrt (Hamann *et al.*, 2006).

2.4.2. Ätiologische Tiermodelle: Das DYT1-Mausmodell

Ätiologische Dystoniemodelle sind Tiermodelle, die durch das Einbringen eines für die humane Dystonie identifizierten Defektgens gekennzeichnet sind (Jinnah *et al.*, 2005). Beim sog. DYT1-Mausmodell wurde das für die Early-onset-TD identifizierte Defektgen von verschiedenen Arbeitsgruppen in das Mausgenom eingebaut (Sharma *et al.*, 2005; Shashidharan *et al.*, 2005; Grundmann *et al.*, 2007). Hierdurch wird bei diesen DYT1-Mäusen zusätzlich zum gesunden Maus-TorsinA auch das mutierte humane TorsinA in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Im Folgenden werden drei DYT1-Mauslinien näher vorgestellt. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Befunde findet sich in Tab. 3.

Grundmann und Mitarbeiter (2007) stellten vier Mauslinien her, von denen zwei das hWT (hWT24, hWT32) und zwei das hMT (hΔGAG3, hΔGAG13) exprimieren. Bei hWT-Mäusen wird das TorsinA um das 2-6fache überexprimiert, bei den hMT-Mäusen liegt das Protein in 1,6-2facher Menge vor. Interessanterweise wurde bei dieser Mauslinie erstmals festgestellt, dass nicht nur das mutierte TorsinA, sondern bereits auch die Überexpression des Wildtyp-Proteins zu zellulären Dysfunktionen in-vivo führen kann. Verhaltensänderungen traten bei diesen Tieren nicht vor dem 5. Lebensmonat auf. Die hMT-Mäuse zeigten eine Hyperlokomotion im Vergleich zu hWT- und Kontrollmäusen, während hWT-Mäuse eine geringere lokomotorische Aktivität im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Die mit Hilfe des Rotarod ermittelte Koordinationsfähigkeit sowie die Fähigkeit zum motorischen Lernen waren bei hMT- im Vergleich zu den hWT- und Kontroll-Mäusen signifikant reduziert. Im "beamwalking Test" zeigten hWT-Mäuse eine längere Überquerungszeit des mittleren und kleinen runden Stabes im Vergleich zu den hMT-Tieren. Die Analyse des Gangbildes ergab für die hWT-Tiere eine deutlich verkürzte Schrittlänge der Vorder- und Hinterpfoten im Vergleich zu hMT- und Kontrolltieren. Histologische Untersuchungen ergaben erstaunlicherweise bei hWT- und hMT-Mäusen den gleichen zellulären Phänotyp. So wurden Veränderungen der Kernhülle im Hirnstamm und im Striatum sowie Einschlusskörperchen in der Nähe des Zellkerns in Hirnstammregionen, dem Hypothalamus und cerebellären Kernen aufgezeigt. Diese Veränderungen waren bei allen vier Mauslinien nachweisbar, traten jedoch bei Linien mit einem höheren Expressionslevel unabhängig vom Genotyp stärker in Erscheinung. Im Rahmen neurochemischer Analysen wurden im Striatum der hWT-Mäuse reduzierte Konzentrationen an DA, Serotonin und 5-HIAA im Vergleich zu hMT- und Kontrollmäusen festgestellt. Keine signifikanten Unterschiede fanden sich hingegen bei DOPAC, HVA, im DOPAC/DA- sowie im HVA/DA-Verhältnis im Striatum der Mäuse. Bei den

DA-Spiegeln gab es im Hirnstamm keine Unterschiede, jedoch lagen bei hWT-Mäusen reduzierte HVA-Konzentrationen im Vergleich zu hMT- und Kontrolltieren vor. hMT-Mäuse zeigten hingegen verglichen mit den hWT- und Kontrollmäusen erhöhte DOPAC-, Serotoninund 5-HIAA-Spiegel.

Shashidharan und Mitarbeiter (2005) haben vier transgene Mauslinien (TG#13, TG#22, TG#35, TG#49) unter Verwendung eines Neuronen-spezifischen Enolase-Promoters hergestellt, die das humane ΔE-TorsinA ca. um das 10fache überexprimieren. Ungefähr 40% dieser Mäuse zeigten ab der 3. Lebenswoche ein abnormes motorisches Verhalten, das sich in einer deutlichen Hyperaktivität, bidirektionellem Circling sowie Dystonie-ähnlichen Bewegungen der Extremitäten während des Hochhebens (sog. "self-clasping") äußerte. Bei einer Mauslinie wurden zudem abnorme Kopfbewegungen in Form eines intermittierenden Tremors und einem zur Seite Neigen des Kopfes beobachtet. Der Schweregrad dieser Symptome nahm mit steigendem Alter zu. In einer neueren Studie ließen sich diese Beobachtungen nur teils bestätigen, wobei die zuvor als "Dystonie-ähnlich" beschriebenen Symptome vereinzelt auch bei Wildtyp-Mäusen beobachtet wurden (Lange, 2009). Mittels immunhistochemischer Untersuchungen wurden bei transgenen Tieren perinukleäre Aggregate festgestellt, die für TA, Ubiquitin und Lamin, einem Marker für die Kernmembran, positiv waren. Am deutlichsten waren diese Einschlüsse in cholinergen Neuronen des PPN ausgeprägt, sie wurden aber auch in pontinen Neuronen sowie in Nervenzellen der periagäduktalen grauen Substanz nachgewiesen (Shashidharan et al., 2005). Die striatalen DA-Spiegel waren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren bei phänotypisch unauffälligen transgenen Mäusen erhöht (+18%) und bei phänotypisch auffälligen transgenen Mäusen deutlich erniedrigt (-39%). Das DOPAC/DA-Verhältnis war hingegen sowohl bei Phänotyp-positiven als auch Phänotyp-negativen transgenen Mäusen niedriger als beim Wildtyp. Niedrige DA-Spiegel wurden auch bei DYT1-Patienten gefunden, allerdings war bei diesen das Verhältnis von DOPAC zu DA erhöht (Augood et al., 2002). Rezeptorautoradiographische Analysen ergaben für Phänotyp-positive TG-Mäuse eine signifikant niedrigere und bei Phänotypnegativen TG-Mäusen eine immerhin tendenziell niedrigere striatale Dichte dopaminerger D₂-Rezeptoren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, die striatale Expression der dazugehörigen mRNA wies hingegen keine Unterschiede auf. Im Gegensatz hierzu wurden in der SNc zwar keine Unterschiede in der D_2 -Rezeptorbindung gefunden, jedoch eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression bei transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Die D₁-Rezeptorbindung sowie die Dichte an Dopamintransportern (DAT) waren im Striatum transgener Mäuse unverändert. In der SNc wurden jedoch signifikant höhere Level an DAT Bindungsstellen bei transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Giannakopoulou et al., 2010). Chiken und Mitarbeiter (2008) wiesen im Rahmen

elektrophysiologischer Studien eine abnorme Aktivität des GPe und GPi sowie eine anhaltende Aktivität agonistischer und antagonistischer Muskeln bei transgenen Mäusen mit abnormen motorischem Verhalten nach. Bao und Mitarbeiter (2010) beschrieben weiterhin, dass sowohl die tonisch als auch phasisch stimulierte DA-Ausschüttung in striatalen Schnitten phänotypisch auffälliger TG-Mäuse signifikant niedriger war als bei phänotypisch unauffälligen TG- und Wildtyp-Mäusen, die Frequenz war hingegen bei Phänotyp-positiven Mäusen höher. Darüber hinaus zeigten hyperaktive Phänotyp-positive Mäuse eine im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren höhere Sensibilität des D₂-Autorezeptors, welche einem niedrigeren extrazellulären DA-Spiegel *in-vivo* entsprechen würde. Interessanterweise trat dieser Effekt nicht auf, wenn nAChR geblockt wurden (Bao *et al.*, 2010).

Sharma und Mitarbeiter (2005) haben drei Mauslinien generiert, die das humane Gen exprimieren: in eine Linie wurde komplementäre DNA (cDNA) vom humanen WT (d.h. "gesundes") TorsinA (hWT) und in zwei andere cDNA vom humanen mutierten TorsinA (hMT) unter Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV)-Promoters eingebracht. Bei diesen Mäusen wird das humane TA im Vergleich zum Maus-TA um das Zweifache überexprimiert. Die hMT-Mäuse zeigten in einem Alter von 9 Monaten moderate Veränderungen der motorischen Funktion im Sinne eines verzögerten motorischen Lernens (Rotarod), das interessanterweise auch bei Menschen, die ansonsten klinisch unauffällige Träger dieses Defektgens sind, beschrieben wurde (Ghilardi et al., 2003). Allerdings konnten die Ergebnisse in der Maus in einer neueren Studie nicht bestätigt werden (Zhao et al., 2008). Bei der Beurteilung des Gangbildes im Footprint-Test wurde bei hWT-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren eine verlängerte Schrittlänge der Vorderpfoten festgestellt (Sharma et al., 2005), bei hMT-Mäusen hingegen war der Abstand zwischen den Hinterpfoten deutlich vergrößert (Zhao et al., 2008). Im Beamwalking-Test zeigten hMT-Mäuse im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren eine signifikant längere Überguerungszeit und häufigeres Ausgleiten. Bei der Bewertung der Lokomotion der Tiere im O-Maze, zeigten hMT-Mäuse eine im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren geringere Bewegungsaktivität, die auch nach Gabe von Amphetamin zu beobachten war (Hewett et al., 2010). In allen drei Mauslinien war die Verteilung des TA mit der in nicht transgenen Kontrolltieren vergleichbar und stimmte mit früheren Beschreibungen einer hauptsächlichen Lokalisation des Proteins innerhalb des ERs überein (Hewett et al., 2000, 2003; Kustedjo et al., 2003). Auch gab es keine Hinweise auf TA- und Ubiquitin-positive zytoplasmatische Einschlusskörperchen bzw. eine Blasenbildung im Bereich der Kernmembran. Bei hMT-Mäusen wurden erhöhte DOPAC-Spiegel im Cerebellum nachgewiesen. Darüber hinaus waren im Kortex die Serotonin-Spiegel bei hWT-Mäusen sowie im Striatum die Gehalte an DOPAC, HVA und Epinephrin bei hMT-Mäusen erhöht. Obwohl keine Unterschiede im striatalen Dopaminspiegel vorlagen, war der Dopaminumsatz (DOPAC/DA und HVA/DA) bei transgenen Tieren erhöht (Zhao *et al.*, 2008). Außerdem war die durch Amphetamin induzierbare Dopaminausschüttung im Striatum von hMT-Mäusen verringert (Balcioglu *et al.*, 2007) und es wurde eine veränderte Aktivität des DAT festgestellt (Hewett *et al.*, 2010). Sciamanna und Mitarbeiter (2009) wiesen weiterhin eine erhöhte GABAerge Aktivität im Striatum der Mäuse nach. Anders als bei hWT- und Kontrolltieren führte der D₂-Agonist Quinpirol bei den hMT-Tieren nicht zu einer Inhibition der GABAergen Aktivität (Sciamanna *et al.*, 2009).

Interessanterweise deuten *in-vitro* Untersuchungen dieser Mäuse auf Fehlfunktionen des cholinergen Systems hin, was mit Beobachtungen einer antidystonen Wirkung infolge einer längeren Gabe von Muskarin-Rezeptor-Antagonisten übereinstimmt. So konnte im Striatum dieser Mäuse eine veränderte Aktivität cholinerger Interneurone beobachtet werden, die auf einen Verlust der M2/M4-Autorezeptor-Funktion zurückgeführt wird. Während cholinerge Interneurone normalerweise über eine D₂-Rezeptor-Aktivierung gehemmt werden, reagierten die striatalen cholinergen Interneurone bei den DYT1-Mäusen mit einer Erregung (Pisani *et al.*, 2006). Rezeptorautoradiographische Studien zur D₁- bzw. D₂-Rezeptorbindungsaffinität und Dichte ergaben allerdings keine Unterschiede zwischen hMT-Mäusen und Kontrolltieren (Balcioglu *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnten Veränderungen in der synaptischen Plastizität und eine erhöhte Acetylcholinesteraseaktivität nachgewiesen werden, die als kompensatorische Reaktion auf eine überschüssige endogene ACh-Konzentration angesehen werden (Martella *et al.*, 2009).

Wie bei den anderen transgenen Mauslinien beschrieben, weist auch das von Sharma und Mitarbeitern (2005) entwickelte DYT1-Mausmodell keine Dystonie-Symptomatik auf. Hinzu kommt, dass in diesen transgenen Mauslinien häufig das tierische gesunde neben dem humanen Defektgen vorliegt und es hierdurch vermutlich zu einem Ausgleich der Fehlfunktionen des humanen Defektgens durch das vorhandene gesunde Gen des Tieres kommen könnte. Dang *et al.* (2005) haben daher eine Mauslinie generiert, indem sie das Mausgenom gezielt an der Stelle veränderten, die homolog zur DYT1-Sequenz von Dystoniepatienten ist, um so auszuschließen, dass das humane mutierte Protein mit dem gesunden Maus-TA interferiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die bisher durchgeführten Untersuchungen der verschiedenen DYT1-Mauslinien leider kein klares Muster an Anomalien erkennen lassen, das eine eindeutige Unterscheidung der Tiere mit abweichender TorsinA-Expression von Wildtyp-Tieren erlaubt. Wichtiger noch ist die Tatsache, dass keines der hier beschriebenen Tiermodelle einen quantifizierbaren Verhaltens-assoziierten Phänotyp aufweist, der den dystonen Bewegungsstörungen beim Menschen zuverlässig entsprechen würde. Die fehlende Dystonie-Symptomatik schließt die Verwendung dieser Tiere zur präklinischen Arzneimittelentwicklung daher aus (Wichmann, 2008). Dennoch könnten Tiere dieser Linien einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Zusammenhänge des identifizierten Defektgens und der daraus resultierenden Pathophysiologie dystoner Bewegungsstörungen leisten und so zum Verständnis des Auftretens von Dystonien in nur 30-40% der DYT1-Genträger beitragen.

Transgene DYT1-Mausmodelle							
Erstbeschreibung	Mauslinie	Verhalten	Anatomie	Physiologie			
Grundmann <i>et al.</i> , 2007	Humanes WT- und ΔE-TA unter humanem Prion Protein Promoter	WT-TA hypoaktiv, ΔE-TA hyperaktiv und reduzierte motorische Fähigkeiten	TA, Laminin und Ubiquitin- positive Einschlusskörper- chen im Hirnstamm bei WT- und ΔE-TA-Linien	↓ DA, HVA, Serotonin			
Shashidharan et al., 2005	Humanes ΔE-TA unter Neuronen-spez. Enolase- Promoter	Hyperkinesie Self-clasping Bidirektionelles Circling	TA und Ubiquitin-positive Einschlusskörperchen in PPN, Pons und PAG	↓ DA, DOPAC/DA			
Sharma et al., 2005	Humanes WT- und ΔE-TA unter humanem Cytomegalo- virus Promoter	 ΔE zeigten reduzierte Lernfähigkeit auf Rotarod (9 Monate alt) ΔE abnormer motorischer Phänotyp im Footprint- und Beawalking Test, keine Auffälligkeiten beim Rotarod (Zhao <i>et al.</i>, 2008a) ΔE reduzierte Lokomotion, auch nach Amphetamin-Gabe (Hewett <i>et al.</i>, 2010) 	Keine Hinweise auf Einschlusskörperchen	Veränderte cholinerge Antwort (Pisani <i>et al.</i> , 2006) Beeinträchtigte DA-Ausschüttung nach Gabe von Amphetamin, keine Unterschiede bzgl. der Konz. von DA und seiner Metabolite, DAT, VMTA2 sowie D ₁ , D ₂ (Balcioglu <i>et al.</i> , 2007) DOPAC/DA, HVA/DA und somit DA-Umsatz Keine Unterschiede in DA-Konz. (Zhao <i>et al.</i> , 2008a) GABAerge Aktivität (Sciamanna <i>et al.</i> , 2009)			

Tab. 3: Zusammenstellung der wichtigsten Befunde in den verschiedenen DYT1-Mauslinien, die von Grundmann *et al.* (2007), Shashidharan *et al.* (2005) und Sharma *et al.* (2005) generiert wurden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nicht sämtliche Ergebnisse aufgenommen.

TA: TorsinA	PAG: periaquäduktale graue Substanz	DOPAC: 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure		droxyphenylessigsäure	HVA: Homovanillinsäure	
DA: Dopamin	PPN: Peduncolopontiner Ncl.	Î.	erhöht	ļ	erniedrigt	

2.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

2.5.1. Zielstellung und Arbeitshypothese

Durch die fehlenden Kenntnisse über die der Erkrankung zugrundeliegenden Mechanismen sind heutige pharmakotherapeutische Ansätze rein empirisch und oft mangelnd wirksam, sodass Dystonien oft in schwere Behinderungen münden. Anticholinergika bewirken zwar eine Besserung bei einigen Dystoniepatienten, diese Medikamente müssen aber häufig über einen langen Zeitraum in hohen Dosierungen eingenommen werden, bevor sie eine antidystone Wirkung entfalten und sind zudem mit einer Vielzahl schwerwiegender Nebenwirkungen behaftet (Jankovic, 2006 und 2009).

Es wird vermutet, dass die Entstehung von Dystonien und die antidystone Wirkung von Anticholinergika bei Patienten im Zusammenhang mit muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) vom Typ 1 und 4 stehen (Pisani *et al.*, 2007). Im Striatum wird die Mehrzahl postsynaptischer mAChR von den Subtypen M1 und M4 gebildet. Anticholinergika, die vornehmlich den M1-Rezeptor blockieren, wie Trihexyphenidyl, Biperiden und Benztropin, sind zwar bei Patienten antidyston wirksam, haben jedoch aufgrund der weiten Verteilung der M1-Rezeptoren im ZNS sowie in peripheren Geweben eine Vielzahl an zentralen und peripheren Nebenwirkungen (Jankovic, 2006; Pisani *et al.*, 2007).

Pharmakologische Studien an Ratten zeigten nun, dass striatale M4-Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Motorik spielen. Aufgrund dessen wurden M4-Rezeptoren als interessante Zielstruktur für die Behandlung von Parkinson-assoziiertem Tremor und der tardiven Dyskinesie beschrieben (Karasawa *et al.*, 2003; Langmead *et al.*, 2008). Darüber hinaus ist die Verteilung des M4-Rezeptors in der Peripherie hauptsächlich auf das Lungengewebe beschränkt (Dörje *et al.*, 1991), weshalb M4-Rezeptor-Antagonisten im Vergleich zu M1-Anticholinergika einen entscheidenden Vorteil bezüglich der Nebenwirkungen für die Dystonie-Therapie bieten könnten. Daher ist der M4-Rezeptor auch als interessantes therapeutisches Target für die Behandlung von Dystonien denkbar.

Die Unklarheit über die zugrundeliegenden Fehlfunktionen des cholinergen Neurotransmittersystems bei der Entstehung von Dystonien verhindert gegenwärtig die Entwicklung von Anticholinergika mit einem effektiveren Wirkungs- und einem abgeschwächten Nebenwirkungsprofil. Gut etablierte Tiermodelle, die aufgrund der Heterogenität dieser Erkrankung genau definiert sein müssen, könnten zur Aufklärung der Beteiligung des cholinergen Systems an der Erkrankung und damit zur Entwicklung von effizienten, rationalen Therapiemaßnahmen beitragen.

Ziel dieses Promotionsvorhabens war es daher, mittels pharmakologischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Studien in zwei anerkannten Tiermodellen für verschiedene Dystonieformen die pathophysiologische Bedeutung des cholinergen Neurotransmittersystems und einzelner mAChR-Subtypen genauer zu untersuchen sowie die Bedeutung des mAChR M4 als therapeutisches Target näher zu beleuchten und damit einen Beitrag zur Verbesserung der Therapieansätze zu leisten.

2.5.2. Untersuchungen im *dt^{sz}*-Hamster

2.5.2.1. Pharmakologische Manipulationen von mAChR

Bei vorangehenden Untersuchungen an *dt^{sz}*-Hamstern stellte sich heraus, dass das Cholinomimetikum Pilocarpin einen prodystonen Effekt aufweist (Löscher und Fredow, 1992). Dieser Befund stimmt mit der Hypothese überein, dass Dystonien auf einem Überschuss an ACh sowie einem Ungleichgewicht im dopaminergen und cholinergen System in den Basalganglien basieren könnten (Sciamanna *et al.*, 2011). Vorangegangene Untersuchungen zeigten auch, dass die einmalige alleinige Verabreichung des **M1-Rezeptor-Antagonisten Trihexyphenidyl** (Löscher und Fredow, 1992) oder des **M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid** (Smiljanic, 2010) nur moderate antidystone Effekte im Sinne einer Verlängerung der Latenzzeit bis zum Eintreten einer paroxysmalen dystonen Episode bei *dt^{sz}*-Hamstern hervorriefen (s. Tab. 4). Der Schweregrad der Dystonie wurde jedoch nicht vermindert.

Daher sollte im vorliegenden Promotionsverfahren untersucht werden, ob durch eine akute, d.h. einmalige systemische Applikation der Kombination von M1- und M4-Rezeptor-Antagonisten ein synergistischer Effekt bei besserer Verträglichkeit erzielt werden kann.

Zurzeit befinden sich keine hochselektiven M4-Rezeptor-Antagonisten auf dem Markt, die die Blut-Hirn-Schranke passieren (Wess, 2004). Der seit langer Zeit in der Ophthalmologie eingesetzte mAChR4-Antagonist Tropicamid zeigt eine moderate Selektivität zum M4-Rezeptor und wurde somit in früheren Untersuchungen oft für die Beurteilung der funktionellen Rolle des mAChR4-Subtyps herangezogen (z.B. Potier und Psarropoulou, 2004; Ukai *et al.*, 2004). Im Rahmen der Untersuchung eines Parkinson-Tremor-Modells konnten Betz und Mitarbeiter (2007) zeigen, dass die durch den ACh-Agonisten Pilocarpin und den Dopamin-Antagonisten Pimozid induzierte Kaubewegungen bei Ratten nach i.p. Applikation von 1,25-20,0 mg/kg Tropicamid dosisabhängig unterdrückt wurden, was darauf hinweist, dass es die Blut-Hirn-Schranke zu passieren vermag (Betz *et al.*, 2007).

		Dosierung (mg/5 ml/kg	Auswirkı	ungen auf	Literaturangabe	
Substanz	Applikationsart	bzw. ng/0,5 μl/Hemisphäre)	Schweregrad	Latenz		
	Systemisch (i.p.) akut	10		1		
Tribeyynhenidyl		15			Löscher und Fredow, 1992	
тттехурненицу		20			Unveröffentlichte Daten	
		30				
	Systemisch (i.p.) akut	15				
		30				
		60		1		
Tropicamid	Systemisch (i.p.) über 21 Tage	30-60		t	Smiljanic, 2010	
		200 ng/0,5 μl				
	Intrastriatale Mikroinjektion	400 ng/0,5 µl				
		800 ng/0,5 µl				

Tab. 4: Übersicht über die Ergebnisse vorangehender pharmakologischer Untersuchungen mit mAChR-Antagonisten bei *dt*^{sz}**-Hamstern**. Dargestellt sind die Effekte des M1-Anagonisten Trihexyphenidyl (nach akut systemischer Applikation) sowie des M4-Antagonisten Tropicamid (akut systemische Applikation, chronisch systemische Applikation über 21 Tage sowie intrastriatale Mikroinjektion) auf die Schweregrade der Dystonie bzw. die Latenzzeit bis zum Auftreten erster eindeutiger dystoner Symptome.

unverändert

1 verzögert

Literaturübersicht

Es ist bekannt, dass Anticholinergika bei Dystoniepatienten zwar bereits nach kurzer Zeit einen moderaten antidystonen Effekt aufweisen können, i.d.R. aber über einen sehr langen Zeitraum von mehreren Wochen bis hin zu Monaten eingenommen werden müssen, bevor sie ihre volle Wirkung entfalten (Jankovic, 2006 und 2009). Auch Ergebnisse im *dt*^{sz}-Hamster zeigten, dass eine langfristige Manipulation mit dem M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid zwar keine Reduktion der Dystonieschwere zur Folge hatte, allerdings wurde beobachtet, dass eine deutlich verzögerte Latenzzeit bis zum Auftreten erster eindeutiger Dystonie-Symptome (Stadium 2) eintrat, was als moderat antidystoner Effekt gewertet werden kann und stärker ausgeprägt war als im Rahmen der einmaligen Applikation der Substanz (Smiljanic, 2010).

Daher sollte neben der oben genannten akut systemischen kombinierten Gabe von M1- und M4-Antagonisten durch eine **langfristige Behandlung der** *dt^{sz}*-Hamster über einen **Zeitraum von 21 Tagen** mit Trihexyphenidyl bzw. einer Kombination aus Trihexyphenidyl und Tropicamid geklärt werden, ob sich auch hier eine stärkere Wirkung im Vergleich zur einmaligen Gabe erzielen lässt und eine mögliche Toleranzentwicklung im Hinblick auf Nebenwirkungen vorhanden ist.

Da der M1-Rezeptor, wie beschrieben, auch insbesondere in peripheren Geweben wie z.B präsynaptisch an Motoneuronen lokalisiert ist, erscheint es denkbar, dass der bei Patienten beschriebene antidystone Effekt von klassischen M1-Anticholinergika auf deren Wirksamkeit an peripheren mAChR1 zurückzuführen ist. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde die antidystone Wirkung von Pirenzepin, einem mAChR1-spezifischen Antagonisten, der nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, nach einmaliger sowie langfristiger systemischer Applikation untersucht. Wegen seiner hohen Selektivität gegenüber M1-Rezeptoren gilt diese Substanz als Prototyp für M1-Rezeptor-Antagonisten (Hammer et al., 1980). Aufgrund seines hydrophilen Charakters kann es nur zu einem sehr geringen Teil die Blut-Hirn-Schranke passieren, sodass seine hauptsächliche Wirkung auf Effekten in der Peripherie beruht (Hammer und Koss, 1979; Carmine und Brogden, 1985). Dies wurde in einer Studie von Worms et al. (1989) bestätigt, in der erst nach systemischer Applikation sehr hoher Dosierungen (50-100 mg/kg) moderate Auswirkungen auf das Verhalten von Ratten nachgewiesen werden konnten. Bei den in dieser Studie verwendeten niedrigeren Dosierungen ist daher von einer rein peripheren Wirkung des Pirenzepins auszugehen. Sollte sich eine antidystone Wirksamkeit von Pirenzepin nachweisen lassen, würde dies bedeuten, dass durch sinnvolle Kombination von zentral und peripher wirksamen Anticholinergika eine möglichst große Effektivität bei gleichzeitiger Reduktion von Nebenwirkungen erzielt werden könnte. Auch hier sollte neben einer einmaligen Gabe

geklärt werden, ob eine langfristige Behandlung mit Pirenzepin über 21 Tage eine Steigerung der antidystonen Wirksamkeit zur Folge hat.

Die **lokale striatale Manipulation** von M4-Rezeptoren mittels Mikroinjektion von Tropicamid im Rahmen vorangegangener Untersuchungen führte nicht zur Reduktion der Dystonieschwere, zeigte aber eine Tendenz zur Verlängerung der Latenzzeit (Smiljanic, 2010).

Um der pathophysiologischen Rolle striataler mAChR am Dystoniegeschehen weiter nachzugehen, wurden bei den *dt^{sz}*-Hamstern im Rahmen der vorliegenden Arbeit daher intrastriatale Mikroinjektionen des M1-Rezeptor-Antagonisten Trihexyphenidyl allein sowie in Kombination mit dem M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid durchgeführt. Die Effekte dieser lokalen Verabreichung dienten zum Vergleich mit denjenigen der akuten systemischen Verabreichung, wodurch Rückschlüsse auf die pathophysiologische Beteiligung des striatalen cholinergen Neurotransmittersystems am Dystoniegeschehen möglich waren.

Außerdem galt es mittels lokaler striataler Manipulationen herauszufinden, inwiefern sich die allosterische Bindungsstelle an mAChR als neues Target zur Therapie dystoner Bewegungsstörungen eignet. Da bis zum heutigen Zeitpunkt keinerlei Veröffentlichungen zu *in-vivo* Effekten von negativ allosterischen Modulatoren auf einzelne muskarinerge Rezeptorsubtypen vorliegen, die therapeutisch sinnvoll einsetzbar wären, wurde in der vorliegenden Arbeit daher der Effekt von **VU0152100**, einem zentral wirksamen **positiv allosterischen Modulator des mAChR4**, bei *dt^{sz}*-Hamstern mittels intrastriataler Applikation untersucht. VU0152100 hat keine direkte agonistische Wirkung, sondern potenziert die M4-Rezeptorantwort gegenüber Acetylcholin. Brady und Mitarbeiter (2008) zu Folge, bewirkte die systemische Applikation von 56,6 mg/kg der Substanz bei Ratten das Aufheben Amphetamin-induzierter Hyperlokomotion.

Die Auswahl der Dosierungen der einzelnen Substanzen erfolgte entweder in Anlehnung an frühere Untersuchungen im *dt*^{sz}-Hamster oder an Literaturangaben für Ratten, Mäuse oder Hamster (s. Tab. 5 und 6), bei denen typische Verhaltenseffekte durch die Wirkstoffe hervorgerufen wurden.

Für die striatalen Applikationen wurden bevorzugt Dosierungen von Substanzen gewählt, bei denen laut Literatur Erfahrungswerte für lokale Mikroinjektionen in das Striatum vorlagen. Waren für diese Gehirnregion keine Literaturangaben verfügbar, wurde auf Dosierungen für andere Gehirnregionen bei Nagern zurückgegriffen. Gab es auch hierzu keinerlei Erfahrungswerte in der Literatur, wurden die entsprechenden Dosierungen anhand der Dosierungen für systemische Applikationen bei Nagern beie Nagern beie VU0152100 um eine relativ neu entwickelte Substanz handelt, war es für diese Substanz

nicht möglich, auf Literaturangaben zu Verhaltenseffekten nach intrastriataler Applikation oder der Applikation in andere Gehirnregionen bei Nagern zurückzugreifen. Daher wurde die Dosierung für die intrastriatale Mikroinjektion anhand der bei Brady und Mitarbeiter (2008) beschriebenen Dosierungen für die systemische Applikation bei Ratten sowie institutseigenen Erfahrungen hinsichtlich striataler Mikroinjektionen berechnet.

2.5.2.2. Rezeptorautoradiographische Untersuchungen von mAChR

In früheren Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Bindungsaffinität von mAChR bei dt^{sz} -Hamstern im Vergleich zu nicht-dystonen Kontrolltieren nachgewiesen werden (Hamann *et al.*, 2006). Durch den Einsatz des nicht-selektiven muskarinergen Liganden [³H]-Quinuclidinyl-Benzilat in dieser Studie sind jedoch bislang keine Aussagen zur pathophysiologischen Beteiligung einzelner Rezeptorsubtypen möglich. Daher sollen im vorliegenden Promotionsvorhaben zusätzlich rezeptorautoradiographische Studien der mAChR-Subtypen 1 sowie 4 im dt^{sz} -Hamstermodell durchgeführt werden.

Zur Manipulation der Bindungsstelle am mAChR1 wurde der spezifische Ligand [³H]-Pirenzepin ausgewählt, da dieser bereits seit Jahrzehnten für Bindungsstudien zur spezifischen Detektion der Bindung an mAChR vom Subtyp 1 Verwendung findet (z.B. Buckley und Burnstock, 1986; Nastuk und Graybiel, 1988).

Aufgrund der bereits beschriebenen Homologie der einzelnen mAChR-Subtypen und der damit einhergehenden hohen Konservierung der Bindungsstellen (Kap. 2.2.3.2.) gibt es derzeit keine verfügbaren spezifischen Liganden zur Untersuchung der Bindung an mAChR vom Subtyp 4. Daher wurde auf den Liganden [³H]-AFDX zurückgegriffen, der zusätzlich zum mAChR M4 auch an den mAChR vom Subtyp 2 bindet (Piggott *et al.*, 2002).

2.5.3. Untersuchung in der DYT1-Maus

Die häufigste genetische Dystonieform ist die Early-onset-TD, bei der eine Mutation im sog. DYT1-Gen zu einer Veränderung im Hitzeschockprotein TorsinA führt. Verschiedene Mauslinien wurden erzeugt, um die pathophysiologische Bedeutung des veränderten Proteins in einem komplexen neurologischen System zu erforschen (Dang *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2005, Shashidharan *et al.*, 2005; Grundmann *et al.*, 2007). Zurzeit am besten untersucht ist die von Sharma und Mitarbeitern (2005) generierte DYT1-Maus. Zwar zeigen diese Mäuse per se keine dystonen Bewegungsstörungen, allerdings könnte dieses Tiermodell einen Beitrag zur Aufklärung der Dystonie-auslösenden Faktoren bei nur ca. 30-40% der Genträger leisten. *In-vitro* Untersuchungen in dieser Linie transgener Mäuse lieferten zahlreiche Hinweise auf Fehlfunktionen des cholinergen Systems im Striatum

(Martella *et al.*, 2009, Pisani *et al.*, 2006). Daher wird vermutet, dass eine erhöhte cholinerge Aktivität eine wichtige Rolle bei diesem DYT1-Mausmodell spielen könnte.

Mit Hilfe der im Rahmen dieses Promotionsvorhabens durchgeführten pharmakologischen *in-vivo* Versuche sollte der funktionellen Relevanz der vorherigen *in-vitro* Befunde nachgegangen werden. Weiterhin sollten immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Aufklärung möglicher Veränderungen des cholinergen Neurotransmittersystems durch das mutierte DYT1-Gen beitragen.

2.5.3.1. Pharmakologische Manipulationen von mAChR

Hierbei sollte zunächst geklärt werden, ob eine durch die **akute**, **d.h. einmalige systemische Verabreichung des Cholinomimetikums Pilocarpin** und einer hieraus resultierenden cholinergen Überaktivität dystone Bewegungsstörungen provoziert werden können. Zur Beurteilung der Effekte einer cholinergen Überaktivität auf das Verhalten und die Motorik transgener DYT1-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren wurden hierzu in Anlehnung an Literaturangaben (Crawley, 1999 und 2000; Karl *et al.,* 2003; Dunnett *et al.,* 2003) eine Reihe etablierter Testverfahren durchgeführt (s. Kap. 3.2.2.2.).

Zur Stimulation von mAChR und einer damit einhergehenden Aktivierung des cholinergen Systems wurde im Rahmen der pharmakologischen Untersuchungen Pilocarpin, ein nicht Subtyp-spezifischer Agonist an mAChR gewählt. Da die Applikation von Pilocarpin in Nagern zur Induktion epileptischer Anfälle sowie eines Status epilepticus führen kann, wurde dieses Alkaloid in den hier durchgeführten Untersuchungen in Dosierungen eingesetzt, die in der Literatur zwar zu Verhaltensänderungen bei Mäusen führten, aber als subkonvulsiv beschrieben sind (s. Tab. 5) (Turski et al., 1984). So wurden nach einmaliger systemischer Applikation der Substanz in einer Dosis von 100 mg/kg bei Mäusen keine abweichenden Verhaltensphänomene mit Ausnahme eines leichten Tremors beobachtet, sodass diese Dosierung als subkonvulsiv angesehen wird (Turski et al., 1984). Bereits ab einer Dosierung von 200 mg/kg Pilocarpin nahm die Bewegungsaktivität der Tiere ab und es wurde vermehrt Tremor sowie ein Myoklonus der Hintergliedmaßen beobachtet. Dosierungen von 300 bis 325 mg/kg führten zu epileptischen Anfällen, die sich in einer Sequenz an Verhaltensänderungen einschließlich initialer Akinesie, Tremor, Ataxie sowie gustatorischen Automatismen mit Salivation, gefolgt von motorisch limbischen Anfällen, die sich in einem Vorderextremitätenmyoklonus, dem Aufrichten und teilweise sogar Umfallen der Tiere äußerten. Während dieser Periode konnten zusätzlich stereotype Verhaltensweisen wie Putzen, wiederholtes Kopfzucken sowie plötzliches Hochspringen beobachtet werden. 400 mg/kg Pilocarpin entsprachen der Lethaldosis bei Mäusen (Turski et al., 1984).
Die Anticholinergika-Behandlung von Dystoniepatienten mit generalisierten Dystonien zeigt, dass die Therapie über mehrere Wochen durchgeführt werden muss, bevor die volle Effektivität erreicht ist. Dies weist darauf hin, dass das cholinerge System langfristig manipuliert werden sollte, um größtmögliche Änderungen hervorzurufen. Analog zu den Untersuchungen im *dt*^{sz}-Hamster wurde daher neben einer einmaligen systemischen Verabreichung auch eine **langfristige Manipulation des cholinergen Systems bei DYT1-Mäusen über einen Zeitraum von 21 Tagen** vorgenommen, um mögliche Veränderungen im Verlauf einer Dauerbehandlung zu untersuchen. Die Dosierung von Pilocarpin wurde hierbei anhand der Befunde der akuten systemischen Gabe ausgewählt.

Zusätzlich zur systemischen Verabreichung des Cholinomimetikums Pilocarpin wurde auch eine **direkte lokale Applikation in das Striatum** durchgeführt. Auf diese Weise konnten die Effekte der systemischen Gabe direkt mit denjenigen nach lokaler Applikation ins Striatum verglichen werden, wodurch Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung striataler Veränderungen des cholinergen Systems möglich waren.

2.5.3.2. Immunhistochemische Untersuchung von striatalen cholinergen Interneuronen und Westernblot-Analysen zur Expression der Cholinacetyltransferase in verschiedenen Gehirnstrukturen

Ergänzend zu vorherigen *in-vitro* Untersuchungen des cholinergen Systems bei diesen Mäusen (Martella *et al.*, 2009; Pisani *et al.*, 2006), sollten neben den pharmakologischen Manipulationen immunhistochemische Untersuchungen cholinerger Interneurone sowie Westernblot-Analysen des Proteins Cholinacetyltransferase Aufschluss darüber geben, ob bei diesen Mäusen aufgrund des mutierten Gens Veränderungen im cholinergen Neurotransmittersystem bestehen. Diese Untersuchungen sollten somit einen Beitrag zur weiteren Charakterisierung der von Sharma *et al.* (2005) generierten DYT1-Mäuse leisten.

Die Immunhistochemie ist eine Methode, die das Detektieren von Antigenen in Gewebeschnitten ermöglicht. Dazu eignen sich besonders Antigene, die spezifisch nur in bestimmten Zelltypen oder nur in bestimmten Geweben auftreten. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten cholinergen Interneurone zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Acetylcholin sowie Cholinacetyltransferase (ChAT) aus. Die Cholinacetyltransferase ist ein Enzym, das die Synthese von ACh aus Cholin und Acetyl-Coenzym A katalysiert. Es wird in Zellsomata gebildet und von dort über den axonalen Transport in die Nervenendigungen befördert. Andere Neurone des Striatums wie z.B. Projektionsneurone weisen hingegen keinerlei cholinerge Komponenten auf, was eine eindeutige Unterscheidung der verschiedenen Neuronentypen ermöglicht (Eckenstein und Thoenen, 1982). Die Cholinacetyltransferase gilt als zuverlässiger Marker cholinerge Interneurone und wurde in

diesem Zusammenhang bereits in früheren Studien zur immunhistochemischen Markierung dieses Interneuronentyps eingesetzt (Kawaguchi *et al.*, 1995 und 1997; Hamann *et al.*, 2006).

Der Westernblot ist ein molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen durch Übertragung auf eine Trägermembran. Nachdem in einem ersten Schritt das Proteingemisch mittels einer Gelelektrophorese entsprechend Ladung und Proteingröße in einzelne Proteinbanden aufgetrennt wird, werden diese Banden anschließend auf eine feste Trägerfolie transferiert. was als Blotting bezeichnet wird. Aufgrund von Ladungswechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membranoberfläche im Muster der elektrophoretischen Auftrennung haften und sind für die Behandlung mit verschiedenen Liganden, Antikörpern oder Enzymsubstraten zur Detektion zugänglich, wodurch nicht nur eine qualitative und quantitative Bestimmung einzelner Proteine in einem komplexen Gemisch anderer Proteine möglich ist, sondern auch deren Identifikation.

Die Westernblot-Analyse wurde in dieser Arbeit als zusätzliches Verfahren zum Nachweis der Cholinacetyltransferase durchgeführt, um Aufschluss über mögliche Veränderungen in der Expression dieses Proteins auch innerhalb anderer Gehirnstrukturen (Kortex, Striatum, Cerebellum und Hirnstamm) zu erhalten.

Substanz	Angegebene Dosierungen	Tierart	Literatur
Tropicamid	1,25-20,0 mg/kg 15,0-60,0 mg/kg	Ratte Hamster	Betz <i>et al.</i> , 2007 Smiljanic, 2010
Trihexyphenidyl	10,0, 20,0 mg/kg	Hamster	Löscher und Fredow, 1992
	15,0, 30,0 mg/kg	Hamster	Unveröffentlichte Daten
	20,0 mg/kg	Maus	Martella <i>et al.,</i> 2009
Pirenzepin	50,0-100,0 mg/kg	Ratte	Worms <i>et al.</i> , 1989
Pilocarpin	100,0-400,0 mg/kg 100,0-400,0 mg/kg	Ratte Maus	Turski <i>et al.</i> , 1983 Turski <i>et al.</i> , 1984

Tab. 5: Die Auswahl der Wirkstoffe und Dosierungen für die systemischen Applikationen erfolgte u.a. in Anlehnung an die angegebenen Literaturstellen, die systemische Applikationen bei Nagern berücksichtigen. Die Literaturstellen sind hier beispielhaft genannt.

Substanz	Angegebene Dosierungen	Tierart	Literatur
Tropicamid	0,1 µg 200, 400, 800 ng	Maus Hamster	Ukai <i>et al.</i> , 2004 Smiljanic, 2010
Trihexyphenidyl	anhand von Dosierungen für die systemische Applikation berechnet	Hamster	s. Tab. 5
VU0152100	30,0, 56,6 und 100,0 mg/kg	Ratte	Brady <i>et al.</i> , 2008
Pilocarpin	anhand von Dosierungen für die systemische Applikation berechnet	Maus	s. Tab. 5

Tab. 6: Die Auswahl der Wirkstoffe und Dosierungen für die striatalen Mikroinjektionen erfolgte u.a. in Anlehnung an die angegebenen Literaturstellen, in denen lokale Applikationen in das Striatum von Nagern durchgeführt wurden. Gab es keine Literaturangaben zu intrastriatalen Mikroinjektionen bei Nagern, wurde auf lokale Applikationen in andere Gehirnregionen ausgewichen bzw. die Dosierungen für die striatale Mikroinjektion anhand der Dosierungen für systemische Applikationen berechnet. Die Literaturstellen sind hier beispielhaft genannt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Versuchstiere

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere sowie die pharmakologischen Untersuchungen fanden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, 14195 Berlin statt.

Für die Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuchsvorhaben lag jeweils eine Genehmigung der zuständigen Behörde vor (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Genehmigungsnummer ZH5 bzw. G 0006/09 und G 0398/09).

3.1.1.1. dtsz-Hamstermutante

Die dt^{sz} -Hamstermutante ist eine rekombinierte Sublinie (UGA 700) Syrischer Goldhamster (Mesocricetus auratus auratus), die ursprünglich aus der Inzuchtlinie BIO 86.93, von "BIO Research Consultants" (Cambridge, MA, USA) durch eine Punktmutation hervorgegangen ist (s. Kapitel 2.4.1.1.). Als Kontrolltiere dienten Syrische Goldhamster einer Auszuchtlinie von Lakeview-Hamstern, die ursprünglich aus dem Zentralinstitut für Versuchstierkunde (Hannover/Empelde, BRD) bezogen wurden und in keiner genetischen Verwandtschaft zur dt^{sz} -Hamstermutante stehen. Kontrollhamster und dt^{sz} -Hamster waren den gleichen Zucht-, Haltungs- und Versuchsbedingungen ausgesetzt. Alle Tests wurden bei jeweils altersgleichen Tieren durchgeführt. Insgesamt wurden 113 dt^{sz} -Hamster in den Versuchen eingesetzt.

3.1.1.2. DYT1-Mausmodell

Für die Versuche wurden männliche und weibliche Tiere einer speziell generierten Mauslinie im Alter von ca. 2 Monaten verwendet, die sich durch die Überexpression des mutierten humanen TorsinA-Proteins auszeichnet. Für die institutseigene Zucht wurden Zuchtpaare transgener DYT1-Mäuse und Kontrolltiere von Dr. Nutan Sharma, Massachusetts General Hospital (Massachusetts, USA) zur Verfügung gestellt (s. Kapitel 2.4.2.). Es wurden jeweils ein Männchen und ein Weibchen verpaart und die gesamte Nachzucht anschließend genotypisiert (Methode s. Punkt 3.2.2.1), um die Träger des Defektgens zu identifizieren. Mäuse, die keine für transgene Tiere typische Bande in der Gelelektrophorese aufwiesen, dienten als Wildtyp-Tiere. Es wurden 29 transgene DYT1-Mäuse und 30 Wildtyp-Tiere in den Versuchen eingesetzt. Die Tiere wurden teilweise wiederholt verwendet, wobei stets darauf geachtet wurde, dass die Tiere zwischen jeder Substanzapplikation mindestens eine Woche Rekonvaleszenzzeit hatten.

3.1.2. Haltung und Fütterung

3.1.2.1. dtsz-Hamster

Die Hamster wurden an ihrem 21. LT vom Muttertier abgesetzt und zunächst wurfweise in Makrolonkäfigen (Normtyp IV) gehalten. Im Alter von etwa 40 Tagen wurden die Tiere nach dem Geschlecht getrennt und in Einzelhaltung verbracht (Makrolon®, Normtyp III). Die Haltung erfolgte auf Standardeinstreu für Labortiere (Altromin, Fa. Altrogge, Lage, BRD, im Laufe der Versuche umgestellt auf Einstreu der Firma ABEDD®-LAB & VET Service GmbH, Wien, AU) bei einer Raumtemperatur (RT) von 23-25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Ein Lichtprogramm mit einer Lichtperiode von 5:00 bis 19:00 Uhr in den Monaten November bis März und von 6:00 bis 20:00 Uhr in den Monaten April bis Oktober sorgte für einen künstlich erzeugten Tag-/Nachtrhythmus. Die Hamster erhielten Trinkwasser und Altromin-Spezial-Diät-Futter (Nr. 7204, Fa. Altrogge, Lage, BRD) ad libitum. Den Tieren wurden zusätzlich Sonnenblumenkerne und getrocknete Grünfutterpellets angeboten. Die Umgebungsbedingungen wurden mit Pappkartons sowie Zellstoff als Nistmaterial im Sinne des "Environmental Enrichement" angereichert.

3.1.2.2. DYT1-Maus

Die Haltung und Zucht der DYT1-Mäuse erfolgte in Räumen der institutseigenen gentechnischen Anlage (S1, 167/00) unter folgenden Standardbedingungen: RT 23 ± 1°C, relative Luftfeuchtigkeit 60 ± 5% und ein zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus mit einer Lichtphase von 6:00 bis 18:00 Uhr. Die Tiere wurden am 21. LT vom Muttertier abgesetzt, genotypisiert (Methode s. 3.2.2.1) und anschließend in Gruppen von 2-3 Tieren in Makrolonkäfigen (Normtyp III) auf Standardeinstreu für Labortiere (Firma ABEDD® - LAB & VET Service GmbH, Wien, AU) gehalten. Die Tiere erhielten Trinkwasser und Standardfutter für Nager (ssniff® R/M/H, Soest, BRD) ad libitum. Zusätzlich wurden Sonnenblumenkerne und getrocknete Grünfutterpellets angeboten. Die Käfigausstattung wurde mit Pappkartons und Zellstoff als Nistmaterial im Sinne des "Environmental Enrichement" versehen.

3.1.2.3. Versuchstiere post operationem

Versuchstiere, die einer stereotaktischen Operation unterzogen wurden (Erläuterung s. Punkt 3.2.1.3.1 sowie 3.2.2.4.1.), wurden post operationem einzeln in hohen Kunststoffkäfigen (Makrolon®, Normtyp III-180) gehalten. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Nahrungs- und Trinkwasseraufnahme wurde den Tieren während der postoperativen Rekonvaleszenzzeit von 2-3 Tagen beim Hamster bzw. 7 Tagen bei der Maus zusätzlich in Wasser eingeweichtes Standardfutter angeboten.

3.1.3. Verwendete Substanzen und Geräte

Tropicamid, DL-**Trihexyphenidyl**-Hydrochlorid, **Pirenzepin**-Dihydrochlorid, **Pilocarpin**-Hydrochlorid, **N-Methyl-(-)-Scopolamin** sowie die beiden Lösungsmittel (2-Hydroxypropyl)β-cyclodextrin und Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim/BRD) bezogen. Die Substanz **VU0152100** (3-amino-N-(4-methoxybenzyl)-4,6dimethylthieno[2,3-b]pyridincarboxamid) wurde von der Firma Axon-Medchem (Groningen/NL) bezogen. Die 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung stammt von der Firma Braun (Melsungen, BRD).

Die verwendeten Substanzen, ihre pharmakologischen Eigenschaften, die gewählten Dosierungen und die Lösungsmittel sind in Tab. 7 für die jeweilige Applikationsart aufgeführt. Die Injektionsvolumina betrugen bei allen systemischen Applikationen beim dt^{sz} -Hamster 5 ml/kg und bei den DYT1-Mäusen 10 ml/kg Körpergewicht (KGW). Bei den lokalen intrastriatalen Injektionen wurden bei beiden Tierarten Volumina von 0,5 µl/Hemisphäre bei einer konstanten Flussrate von 0,1 µl/Minute appliziert.

Alle Substanzlösungen wurden direkt vor Versuchsbeginn angesetzt. Trihexyphenidyl und Pirenzepin lagen als Hydrochlorid bzw. Dihydrochlorid vor und wurden in dieser Form auch eingesetzt, während Pilocarpin-Hydrochlorid nach reziproker Umrechnung als Reinsubstanz verwendet wurde. Die benötigten Wirkstoffmengen wurden auf einer Feinwaage (Fa. Sartorius, Göttingen, BRD) abgewogen und anschließend auf einem Magnetrührer (IKA-Combimag RGT, IKA, Staufen, BRD) im Lösungsmittel (Vehikel) gelöst. Die Dosierungen wurden in Anlehnung an Literaturangaben bei Nagern gewählt, in denen die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanzen charakteristische Verhaltensänderungen hervorriefen (s. Kap. 2.5., Tab. 5 und 6).

Die Bezugsquellen weiterer verwendeter Geräte sowie angewandte Computerprogramme sind den Tabellen I und II im Anhang zu entnehmen.

Tiermodell	Substanz	Pharmakologische Wirkung	Dosierungen (mg/5 ml/kg bzw. mg/10 ml/kg) bzw. (/0,5 μl/Hemisphäre)			Lösungsmittel
			Systemisch (i.p.) akut	Systemisch (i.p.) über 21 Tage	Intrastriatale Mikroinjektion	
	Trihexyphenidyl- Hydrochlorid	M1 ACh-Rezeptor- Antagonist		20	200, 400, 800 ng/0,5 µl	Cyclodextrin 20% bzw. 10%
<i>dt^{sz}-</i> Hamster	Tropicamid	M4 ACh-Rezeptor- Antagonist	15, 30, 60	30	200, 400, 800 ng/0,5 µl	Cyclodextrin 20%
	+ Trihexyphenidyl- Hydrochlorid	M1 ACh-Rezeptor- Antagonist	10, 15, 30	15	200, 400, 800 ng/0,5 µl	bzw.10%
	Pirenzepin- Dihydrochlorid	M1 ACh-Rezeptor- Antagonist nicht BHS-gängig	25, 50	25		0,9%ige NaCl- Lösung
	VU0152100	M4 ACh-Rezeptor- Positiver allosterischer Modulator			0,125; 12,5 ng/0,5 µl	DMSO 5%
DYT1- Maus	Pilocarpin	Nichtselektiver ACh-Rezeptor- Agonist	75, 100, 125	100	25, 50 µg/0,5 µl	Aqua ad inject.
	N-Methyl- Scopolamin	Nichtselektiver ACh-Rezeptor- Antagonist nicht BHS-gängig	1	1		Aqua ad inject.

Tab. 7: Überblick über die verwendeten Substanzen, den manipulierten Rezeptortyp, die Dosierungen und die Konzentration des Lösungsmittels bei der Durchführung der systemischen (i.p.) akuten Versuche, der systemischen (i.p.) chronischen Versuche über 21 Tage (Injektionsvolumen *dt*^{sz}-Hamster 5 ml/kg; DYT1-Maus 10 ml/kg KGW) sowie der intrastriatalen Mikroinjektion (jeweils 0,5 µl/Hemisphäre bei einer konstanten Flussrate von 0,1 µl/Minute).

ACh: Acetylcholin DMSO: Dimethylsulfoxid KGW: Körpergewicht NaCl: Natriumchlorid BHS: Blut-Hirn-Schranke Aqua ad injectabilia

3.2. Methoden

3.2.1. dtsz-Hamster

3.2.1.1. Induktion und Beurteilung der paroxysmalen Dystonie

Die Versuchstiere wurden am 21. LT vom Muttertier abgesetzt, mit Ohrmarkierungen versehen und erstmals getestet. Die Auslösung der Dystonie erfolgte nach der standardisierten "triple stimulation technique" (Löscher *et al.*, 1989; Richter und Löscher, 1998). Dieses Verfahren setzt sich aus folgenden Punkten zusammen:

- 1. Herausfangen des Einzeltieres aus dem Gruppen- bzw. nach der Operation aus dem Einzelkäfig, Umsetzen in eine Tierwaage, Herausfangen aus der Tierwaage.
- Fixieren des Tieres und Injektion des Vehikels (Vor- und Nachkontrolle) bzw. der Substanzlösung. Die Applikation erfolgte entweder intraperitoneal (Injektionsvolumen 5 ml/kg) oder intrastriatal (0,5 μl/Hemisphäre).
- Umsetzen des Einzeltieres in einen leeren Makrolonkäfig zur anschließenden dreistündigen Beobachtung.

Die Induktion der dystonen Episoden erfolgte im Abstand von 2-3 Tagen, um eine mögliche Refraktärphase infolge von Erschöpfungszuständen des vorhergehenden Testtages zu vermeiden. Die Untersuchungen fanden in einem vom Tageslicht abgeschirmten Versuchsraum (Lichtintensität zwischen 320 und 480 Lux, die RT betrug zwischen 22° und 26°C) in der Zeit von 8:00 bis 13:00 Uhr statt.

Der individuell maximal erreichbare Schweregrad der Dystonie wird i.d.R. innerhalb von 3 h nach Stressinduktion erreicht (Richter, 2005). Während der dreistündigen Beobachtungsphase wurden die Tiere daher durch taktile Reize wie z.B. Anstoßen der Flanke mit einem Stift, am Schlafen gehindert, da der Schlafzustand eine Abschwächung dystoner Bewegungsstörungen bewirkt (Richter und Löscher, 1998). Um gezielt dt^{sz}-Hamster mit reproduzierbaren Dystoniestadien zu selektieren, wurden bei den Tieren zwischen dem 21. und dem 28. LT wie beschrieben wiederholt dystone Episoden ausgelöst. Nur Tiere mit reproduzierbaren Stadien wurden in den Versuchen eingesetzt. Während des Versuches wurden Körpergewicht (KGW), der Injektionszeitpunkt, die verschiedenen Dystonie-Schweregrade mit dem jeweiligen Zeitpunkt des Einsetzens sowie Verhaltensauffälligkeiten (Nebenwirkungs-bedingt) protokolliert.

Um die pharmakologische Beeinflussung der Dystonie möglichst objektiv erfassen zu können, wurde die Beurteilung der Dystonie anhand eines etablierten Score-Systems vorgenommen (Richter, 2005). Dieses Score-System umfasst 6 Stadien, in denen die unterschiedlichen Schweregrade genau definiert sind:

- **Stadium 1:** Stark angelegte Ohren sowie eine abgeflachte Körperhaltung der Tiere beim Laufen sind für dieses Stadium kennzeichnend.
- **Stadium 2**: Die Tiere zeigen ein verhaltenes, zögerndes Aufsetzen der gestreckten Vordergliedmaßen beim Laufen. Zudem wird ein häufiges Aufrichten ("Rearing"), verbunden mit abnormen Bewegungen der Vorderextremitäten und bilaterale Verzerrungen der Gesichtsmuskulatur mit freigelegten Schneidezähnen ("Grimassieren"), beobachtet.
- **Stadium 3:** Es treten zusätzliche motorische Störungen auf. Infolge einer Muskeltonuserhöhung in den Hintergliedmaßen zeigt sich eine steife Haltung mit bizarrem Gang ("wie auf Zehenspitzen").
- Stadium 4: Durch zunehmende Muskelkontraktionen in Rumpf und Gliedmaßen verlieren die *dt^{sz}*-Hamster ihre Balance und kippen unter schraubenartigen Bewegungen zur Seite oder vornüber.
- Stadium 5: Aufgrund des vollständigen Funktionsverlustes der nach kaudal gestreckten Hintergliedmaßen können sich die Tiere nur noch mühsam über die Vordergliedmaßen fortbewegen.
- Stadium 6: Dieses maximale Stadium ist durch die Immobilität der Tiere mit nach kranial gestreckten Vorder- und Hinterextremitäten und einem nach oben gekrümmten Schwanz charakterisiert. Neben windenden Halsbewegungen und Opisthotonus können gelegentlich rötliche Tränenflüssigkeit, Salivation sowie abwechselndes Anheben der Vordergliedmaßen auftreten.

Die Tiere durchlaufen unter Einhaltung der oben beschriebenen Reihenfolge nicht immer alle Stadien, sodass zum Erreichen des maximalen Schweregrades Stadien z.T. "übersprungen" werden oder eine Erholung, d.h. eine Reduktion des Schweregrades innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 3 h, bei einer durchschnittlichen Dauer der dystonen Episoden von 2-5 h, eintreten kann (Richter und Löscher, 1998).



Abb. 8 A-F: Dystone Bewegungen und Haltungen des *dt*^{sz}-Hamsters nach Stressinduktion durch die "triple stimulation technique". Dargestellt sind die verschiedenen Stadien von 1-6. A) Stadium 1: abgeflachte Körperhaltung des Hamsters mit angelegten Ohren, B) Stadium 2: verzögertes Aufsetzen der gestreckten Vordergliedmaßen, C) Stadium 3: bizarrer Gang aufgrund des erhöhten Muskeltonus in den Hinterextremitäten, D) Stadium 4: Verlust des Gleichgewichts und seitliches Umfallen unter schraubenartigen Bewegungen, E) Stadium 5: vollständiger Funktionsverlust der nach kaudal gestreckten Hintergliedmaßen, F) Stadium 6: vollständige Immobilisation mit nach kranial gestreckten Vorder- und Hinterextremitäten, Opisthotonus und Salivation.

In früheren Studien konnte ein altersabhängiger Verlauf der dystonen Bewegungsstörungen bei der *dt*^{sz}-Hamstermutante nachgewiesen werden (Löscher *et al.*, 1995). Dystone Episoden zeigen sich erstmals am 16. LT und erreichen zwischen dem 30. und 42. LT schwerste Ausprägungen. Dieser auch als MAX-Phase bezeichneter Zeitraum ist geeignet, um Substanzen auf ihre antidystonen Eigenschaften zu testen. Danach nimmt der Schweregrad bis zur Spontanremission kontinuierlich ab, sodass ab ca. dem 70. LT keine dystonen Störungen durch Stress mehr induzierbar sind (Richter und Löscher, 1998). Da frühere Untersuchungen mit einmaligen systemischen Gaben von AChR-Antagonisten eine moderate antidystone Wirkung der Substanzen zeigten (Löscher und Fredow, 1992), erfolgten die für diese Dissertation durchgeführten Untersuchungen stets in der MAX-Phase.

Neben den einzelnen Schweregraden der Dystonie können noch zwei weitere Kriterien zur Beurteilung antidystoner Eigenschaften einer Substanz herangezogen werden:

- Latency to onset: kurz **"Latency on"**, bezeichnet den Zeitraum bis zum Auftreten erster eindeutiger dystoner Bewegungsstörungen (Stadium 2)
- Latency to maximum: kurz **"Latency max"**, bezeichnet den Zeitraum bis zum Erreichen des maximalen Stadium 6

Diese Zeiträume erlauben genauere Rückschlüsse auf die Progression der Dystonie (Fredow und Löscher, 1991; Löscher *et al.*, 1989; Richter und Löscher, 1998).

Des Weiteren erfolgte eine Beurteilung der Hyper- und Hypolokomotion der Tiere während der Untersuchungen. Hierfür wurde initial ein taktiler Reiz gesetzt und die darauffolgende lokomotorische Aktivität der Tiere wie folgt bewertet:

Wenn sich das Tier auf den Reiz hin kurzzeitig bewegte, lag keine Hyperlokomotion vor. Die Tiere zeigten eine geringgradige Hyperlokomotion, wenn nach dem Reiz eine verstärkte Bewegung auftrat, die jedoch von Ruhepausen unterbrochen wurde. Waren diese Pausen nur sehr kurz, handelte es sich um eine mittelgradige Hyperlokomotion. Ununterbrochener Bewegungsdrang wurde als hochgradige Hyperlokomotion gewertet. Eine geringgradige Hypolokomotion hingegen war gegeben, wenn sich das Tier nach dem initialen Reiz bis zur nächsten Ecke bewegte. Bei der mittelgradigen Hypolokomotion gingen die Tiere nur einige Schritte, wohingegen gar keine Bewegung als hochgradige Hypolokomotion gedeutet wurde.

3.2.1.2. Systemische pharmakologische Manipulation von mAChR

Zur Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung des cholinergen Neurotransmittersystems im Dystoniegeschehen des dt^{sz} -Hamsters wurden folgende Vorgehensweisen gewählt:

- einmalige systemische intraperitoneale (i.p.) Applikation
- tägliche systemische i.p. Applikation über einen Zeitraum von 21 Tagen
- einmalige intrastriatale Mikroinjektion zur direkten lokalen pharmakologischen
 Manipulation striataler muskarinerger Acetylcholinrezeptoren

3.2.1.2.1. Einmalige systemische intraperitoneale Applikation

Im Falle der einmaligen systemischen Applikation erfolgte die Injektion der zu untersuchenden Substanzen bzw. des Vehikels (Injektionsvolumen: 5 ml/kg i.p.) zwischen dem 30. und 42. LT, d.h. in der Lebensphase mit der höchsten Ausprägung der Dystonie. Dabei wurde den Tieren unter gleichen Versuchsbedingungen zwei Tage vor bzw. nach der eigentlichen Substanzapplikation das Vehikel appliziert. Die Vehikelapplikationen bieten einerseits Vergleichswerte für die Wirkung der Substanz und andererseits eine Kontrolle über Schwankungen in der Ausprägung der Dystonie. Es wird somit sichergestellt, dass die Tiere stets in der Phase der höchsten Dystonieausprägung, der sog. MAX-Phase getestet werden und sich nicht bereits in Remission befinden. Da ein und demselben Tier sowohl das Vehikel als auch die Substanz appliziert wurde, kann das Tier als seine eigene Kontrolle gewertet werden und die Versuchstierzahl somit beträchtlich reduziert werden. Im Anschluss an die Stressinduktion mittels der bereits beschriebenen "triple stimulation technique" erfolgte die Beobachtung der Versuchstiere über 3 h, in denen Stadien, Latenzzeiten und Nebenwirkungen protokolliert wurden.

Für die akut systemischen Versuche wurden insgesamt 25 Hamster verwendet.

3.2.1.2.2. Chronischer Versuch über einen Zeitraum von 21 Tagen

Für die tägliche i.p. Injektion über einen Zeitraum von 21 Tagen wurden zwei verschiedene Würfe von *dt*^{sz}-Hamstern i.d.R. am 21. LT vom Muttertier abgesetzt. Die Tiere beider Würfe wurden gleichmäßig aufgeteilt, sodass jeweils eine Hälfte von jedem Wurf die zu untersuchende Substanzlösung erhielt, während der anderen Hälfte das entsprechende Vehikel (Injektionsvolumen: 5 ml/kg i.p.) verabreicht wurde. Die Applikation der Substanz bzw. des Vehikels wurde in der Zeitspanne vom 22. bis zum 42. LT der Tiere täglich durchgeführt. In diesem Zeitraum wurden die Tiere wie bereits beschrieben alle zwei bis drei Tage nach Induktion dystoner Episoden auf ihre Dystonieausprägung hin untersucht. Im Anschluss an diese 21tägige Behandlung erfolgte eine zusätzliche Verlaufskontrolle, bei der

beiden Tiergruppen bis zum 59. bzw. 60. LT 0,9%ige Kochsalzlösung appliziert wurde und erneut alle zwei bis drei Tage die Ausprägung der Dystonie überprüft wurde. Dieses Vorgehen diente dazu, den Einfluss der Langzeitbehandlung auf den Zeitverlauf der Spontanremission sowie einen möglichen Rebound-Effekt nach Absetzen der Testsubstanz abzuklären. Die Substanzen wurden vor den Versuchen verschlüsselt, sodass der Untersucher keine Kenntnis darüber hatte, welchen Tieren die Testsubstanz bzw. das Vehikel appliziert wurde. Erst nach Ablauf des 60. LT der Tiere wurden die Substanzen entschlüsselt und es erfolgte die Zuordnung zu den jeweiligen Tiergruppen.

Für die chronischen Versuche wurden insgesamt 44 *dt*^{sz}-Hamster verwendet.

3.2.1.3. Striatale Mikroinjektionen von Stoffen mit Wirkung auf mAChR

3.2.1.3.1. Stereotaktische Implantation der Führungskanülen

Zwischen dem 28. und 30. LT wurden die *dt^{sz}*-Hamster operiert, um Führungskanülen für die späteren bilateralen striatalen Mikroinjektionen chronisch zu implantieren. Die Operation basiert auf einer Methode von Paxinos und Watson (2001).

Zur Anästhesie wurde den Hamstern 70 mg/kg KGW Pentobarbital (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) mit einem Injektionsvolumen von 5 ml/kg KGW i.p. verabreicht. Nach der Rasur des Kopfes im Bereich des Operationsfeldes wurden die Tiere mit Hilfe zweier metallischer Stifte in den äußeren Gehörgängen und einer Fixierung des Oberkiefers in eine stereotaktische Apparatur (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, BRD) eingespannt. Zur Desinfektion des Operationsfeldes diente 70%iger Ethanol.

Anschließend wurden die Kopfhaut und die Unterhaut über eine Länge von ca. 15 mm median eröffnet, die Schädeldecke durch stumpfe Präparation freigelegt und das darunterliegende Periost mittels eines Skalpells vom Schädelknochen gelöst. Zur Desinfektion, Blutstillung und einer besseren Darstellung der bindegewebigen Knochennähte wurde der Schädelknochen mit 30% igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) benetzt. Dadurch waren die beiden Kreuzungspunkte Sutura Lamboidea (Lambda) und Bregma (s. Abb. 9) deutlich sichtbar, sodass sie anschließend auf gleicher Ebene ausgerichtet werden konnten. Von Bregma ausgehend wurden die Koordinaten der Trepanationsstellen für die chronische Implantation der beiden Führungskanülen bestimmt.



Abb. 9: Aufsicht auf einen Mausschädel (nach Paxinos und Watson, 2001). Gekennzeichnet sind die Kreuzungspunkte der Knochennähte Bregma und Lambda. Diese Punkte dienen bei der stereotaktischen Operation zur Orientierung bei der dorsoventralen Ausrichtung des Schädels sowie für die Lokalisation der Führungskanülen und der Halteschrauben. Die Darstellung entspricht dem vergleichbaren Vorgehen bei der stereotaktischen Operation eines Hamsters.

Die Koordinaten wurden in Anlehnung an frühere Veröffentlichungen (Hamann und Richter, 2002; Sander und Richter, 2007) und eigene Vorversuche ermittelt und betrugen 1,5 mm anterior und 2,5 mm lateral zu Bregma. Des Weiteren wurden drei weitere Trepanationsstellen für die Halteschrauben markiert. Anschließend wurde die Bohrung der Trepanationsstellen vorgenommen (Bohrer: Dremel, Breda, NL). Nach dem Eindrehen der drei Halteschrauben wurden die beiden Führungskanülen (Länge: 8,0 mm, äußerer Durchmesser: 0,70 mm, innerer Durchmesser: 0,45 mm) auf 3,0 mm ventral von Bregma abgesenkt und mit dem Kunststoff-Kaltpolymerisat Paladur® (Heraeus Kulzer, Hanau, BRD) zusammen mit den Halteschrauben an der Schädeldecke fixiert. Nach Aushärtung des Kunststoff-Kaltpolymerisats wurde die Kopfhaut rostral durch ein Einzelheft und kaudal des Paladur®-Aufbaus durch ein U-Heft adaptiert. Um einer Verlegung bzw. Verunreinigung der Führungskanülen durch Einstreu vorzubeugen, wurden Mandrins eingesetzt. Nach Beendigung der Operation wurden die Tiere auf einer Wärmematte bis zum Erwachen unter postoperative Beobachtung gestellt.

Zur analgetischen Abschirmung wurde den *dt*^{sz}-Hamstern eine Stunde vor dem operativen Eingriff Carprofen 5 mg/kg subkutan appliziert. Auf eine weitere analgetische Behandlung wurde bei diesem Tiermodell verzichtet, da es aufgrund des kleinen Zeitfensters, in dem die Substanzen getestet werden, zu Wechselwirkungen der Analgetika mit den zu untersuchenden Substanzen kommen könnte.

3.2.1.3.2. Mikroinjektionstechnik

Die pharmakologischen Untersuchungen erfolgten bei den dt^{sz}-Hamstern nach einer 2-3 tägigen postoperativen Rekonvaleszenzzeit. Hierfür wurde den Tieren zunächst in einer Vorkontrolle das Vehikel direkt in das dorsale Striatum appliziert. Die Vorgehensweise hierfür erfolgte in Anlehnung an die "triple stimulation technique" (s. Punkt 3.2.1.1.), d.h. die Hamster wurden aus dem Heimkäfig herausgefangen, gewogen und nach dem Herausfangen aus der Tierwaage mit einer Hand fixiert, um mit der anderen Hand die Führungskanülen zu entfernen. Anschließend wurden Mandrins aus den die Injektionskanülen eingesetzt, welche einen äußeren Durchmesser von 0,40 mm, einen inneren Durchmesser von 0,20 mm und eine Länge von 8,5 mm hatten, so dass sie nach dem Einführen in die Führungskanülen dieselben um 0,5 mm überragten. Die Injektionskanülen waren über einen durchsichtigen Mikrotubus aus flexiblem Plastik der Firma CMA (Solna, Schweden) mit jeweils einer Hamilton-Spritze (Bonaduz, Schweiz) mit einem Fassungsvolumen von 0,5 µl verbunden (s. Abb. 10). In diesen Plastik-Schläuchen wurde, durch zwei Luftblasen getrennt vom Vehikel bzw. der Substanz auf der Ausgangsseite und Aqua dest. auf der Eingangsseite, eine Farbstofflösung (Thionin) aufgezogen. Die Bewegung der Thioninlösung im Schlauch ermöglichte während der Injektion eine Kontrolle der applizierten Menge. Das Injektionsvolumen von 0,5 µl wurde über einen Zeitraum von 5 min (0,1 µl/min) bilateral appliziert, während die Hamster sich im Käfig frei bewegen konnten. Anschließend verblieben die Injektionskanülen weitere 5 min in den Führungskanülen, um ein vollständiges Diffundieren der Vehikel- bzw. Substanzlösung in das umgebende Gewebe zu gewährleisten. Danach wurden die Hamster wieder aus dem Käfig gefangen und fixiert, um die Injektionskanülen zu entfernen und die Mandrins einzusetzen. Es folgte die Beobachtung der Versuchstiere über 3 h, in denen Stadien, Latenzzeiten und Nebenwirkungen protokolliert wurden. Im Anschluss an diese erste Vehikelkontrolle (pre-drug-control) wurde nach zwei Tagen die Substanzlösung und nach zwei weiteren Tagen erneut das Vehikel (post-drug-control) appliziert. An denselben Tieren wurde die Applikation von teils drei unterschiedlichen Dosierungen derselben Substanz vorgenommen, zwischen denen jeweils ein Zeitraum von 4-5 Tagen lag. Zur Überprüfung der Lokalisation der Führungskanülen wurden die Hamster im Anschluss an die Versuchsreihe perfundiert (s. Punkt 3.2.1.3.3.).



Abb. 10: Das Mikroinjektionssystem. Zwei Hamilton-Spritzen (Fassungsvolumen = Injektionsvolumen = 0,5 μI) sind über Adapter mit je einem Plastikschlauch verbunden. Diese sind wiederum über Adapter mit den Injektionskanülen verbunden. Zwischen der Substanz- bzw. Vehikellösung und dem Aqua dest. ist eine durch Luftblasen separierte Farblösung aufgezogen, die eine kontrollierte Applikation ermöglicht (Abb. modifiziert nach Sander, 2004; Quelle Hamsterbild: http://www.petwebsite.com/hamsters/hamsters_images/syrian-hamster_000008437184.jpg).

3.2.1.3.3. Perfusion und histologische Untersuchungen zur Bestimmung der Lokalisation der Führungskanülen

Zur Überprüfung der korrekten Lokalisation der Führungskanülen wurden nach Abschluss der pharmakologischen Untersuchungen histologische Schnitte von den Gehirnen der Versuchstiere angefertigt. Hierfür wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital (100 mg/kg KGW i.p.) in eine tiefe Narkose versetzt. Erst als die Atmung und der Herzschlag der Tiere ausgesetzt hatte und keine Tiefensensibilität mehr vorlag, wurden sie in gestreckter Haltung auf dem Rücken liegend fixiert. Nach Eröffnung der Brusthöhle mit einer Schere und Freilegung des Herzens folgte die Punktion des linken Herzventrikels und das Einführen sowie Befestigen einer Knopfkanüle. Anschließend wurde das rechte Herzohr angeschnitten. Die Knopfkanüle war über ein Schlauchsystem und einen Drei-Wege-Hahn mit 2 Behältern verbunden, welche zum einen Fixanslösung (phosphatgepuffertes 4%iges Paraformaldehyd) und zum anderen 0,01 M phosphatgepufferte NaCI-Lösung enthielten (Herstellung der Lösungen s. tabellarischen Anhang). Um die Bildung von Blutkoagula zu vermeiden, wurde erst eine Spülung mit 0,01 M phosphatgepufferter NaCI-Lösung (pro Tier ca. 80 ml) vorgenommen. Daraufhin erfolgte mit etwa 100 ml 4%igem Paraformaldehyd die Fixierung

des Gewebes. Zur Vermeidung von Gewebeschädigungen wurden die Gehirne nach der Entnahme für 24-48 h in einer 30%igen phosphatgepufferten Zuckerlösung (Herstellung s. Tabelle C im Anhang) aufbewahrt. Nach Markierung der rechten Hemisphäre konnten mit einem Gefriermikrotom (MICROM, Walldorf, BRD) 40 µm dicke Transversalschnitte angefertigt werden. Nach Auffangen in 0,1 M Phosphatpuffer wurden die Gehirnschnitte in Schnittreihenfolge mit einer Gelatinelösung (Herstellung s. Anhang, Tabelle C) auf entfettete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden anschließend mit Thionin (Herstellung und Färbeprotokoll s. Anhang) gefärbt und mit Entellan® (Merck, Darmstadt, BRD) eingedeckt. Nach ihrer Trocknung konnten die Schnitte unter dem Lichtmikroskop begutachtet und hinsichtlich der Lokalisation der Führungskanülen mit Hilfe des stereotaktischen Atlas für das Hamstergehirn (Morin und Wood, 2001) ausgewertet werden.

Tiere, deren Führungskanülen nicht im dorsalen Bereich des Striatums lokalisiert waren (s. Abb. 11) oder deren Schnitte deutliche Zeichen einer Infektion aufwiesen, wurden nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen.

Für die intrastriatalen Mikroinjektionen wurden insgesamt 44 Hamster verwendet, von denen einer aufgrund der fehlerhaften Lokalisation und weitere neun Tiere infolge einer Infektion nicht mit in die Auswertung einbezogen werden konnten.



Führungskanülen mit eingesetzten Injektionskanülen

Abb. 11: Der Transversalschnitt eines Hamstergehirns illustriert die Lokalisation der chronisch implantierten Führungskanülen (grau) mit den eingesetzten Injektionskanülen (schwarz gestrichelt). Des Weiteren ist die Unterteilung des mittleren Gehirnbereichs in das dorsomediale (dm), dorsolaterale (dl), ventromediale (vm) und ventrolaterale (vl) Striatum dargestellt.

3.2.1.4. Rezeptorautoradiographische Analyse der mAChR-Subtypen M1 und M2/M4

Für die rezeptorautoradiographischen Untersuchungen wurden zwei verschiedene Gruppen von Hamstern (10 dt^{sz}-Hamster und 10 Kontrolltiere) am 21. LT vom Muttertier abgesetzt und anschließend zweimal nach Induktion dystoner Episoden anhand der bereits erläuterten "triple stimulation technique" auf ihre Dystonieausprägung hin untersucht. An ihrem 31. LT wurden die Tiere ohne weitere Stressinduktion mittels Isofluran-Anästhesie in eine tiefe Narkose versetzt und dekapitiert. Die Gehirne wurden zügig entnommen, direkt zum sofortigen Gefrieren auf Trockeneis verbracht und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die gefrorenen Gehirne auf Trockeneis zu unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Jose N. Nobrega (Neuroimaging Research Section, Centre for Addiction and Mental Health, Toronto, Kanada) geschickt, wo die nachfolgend rezeptorautoradiographischen Untersuchungen durchgeführt wurden. beschriebenen Zunächst wurden mit Hilfe eines Kryostaten bei -20°C Gewebeschnitte (20µm) angefertigt und auf SuperFrost[®]Plus Objektträger aufgezogen. Um eine Bindung an die mAChR zu ermöglichen, wurden die Schnitte zunächst auf RT gebracht und für 30 min in 10 mM PBS-Puffer (pH 7,4) bei 4°C vorinkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte für 60 min bei RT in einer Pufferlösung, die mit [H³]-Pirenzepin für M1-Rezeptoren bzw. [H³]-AFDX für M2/M4-Rezeptoren versetzt war. Nach ausreichender Inkubationszeit erfolgte eine zweifache Spülung der Objektträger zunächst in eiskalter 10 mM Pufferlösung und danach in bidestilliertem Wasser, um ungebundene Liganden abzuwaschen. Anschließend wurden die Objektträger unter einem kalten Luftstrom getrocknet, auf [H³]-sensitive Röntgenfilme aufgebracht und in lichtdichten Röntgenkassetten für vier Wochen gelagert. Nach der Entwicklung der Filme wurde die optische Dichte der Rezeptorbindungsstellen (in Form von Grauwerten auf den Filmen) mittels kalibrierter Standards, die bei der Exposition mitgeführt wurden, ermittelt. Die Gehirnregionen, in denen die Rezeptorbindung gemessen wurde, wurden in Anlehnung an den Hamsteratlas nach Morin und Wood (2001) definiert.

3.2.2. DYT1-Maus

3.2.2.1. Genotypisierung

Die Genotypisierung der transgenen Tiere erfolgte anhand von Kotproben gemäß des bereits veröffentlichten Protokolls (Hamann et al., 2010). Hierfür wurden die Tiere nach dem Absetzen vom Muttertier einzeln in leere, sterile Makrolonkäfige gesetzt. Innerhalb weniger Minuten wurden bis zu drei Kotpellets (je ~20 mg) abgesetzt, die mit einer sterilen Pinzette aufgesammelt und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß (2,0 ml) verbracht wurden. Die anschließende Extraktion und Aufreinigung der DNA aus den Kotproben erfolgte mittels eines DNA Extraktionskits für Stuhl-/Kotproben (EURx® Gene Matrix Stool DNA kit, Roboklon GmbH, Berlin, BRD) nach Herstellerangaben (Protokoll s. Anhang). Dieser Extrakt wurde tiefgefroren oder direkt für die nachfolgende PCR verwendet, die in Anlehnung an die von Sharma et al. (2005) beschriebene Genotypisierung erfolgte. Hierfür wurde die DNA-Konzentration der Extrakte photometrisch (Biowave S 2100, Biochrom, Cambridge, UK) bestimmt und ein 20 µl Ansatz hergestellt, der folgende Komponenten enthielt: 2 µl 10xTag-Puffer, 0,4 µl dNTP's, 0,16 µl Taq-Polymerase (Taq-DNA-Polymerase ,all inclusive', PEQLAB, Erlangen, BRD), 0,16 µl (8 pmol) Primer forward (5'- GCGTCTCTACTGCCTCTTCG-3'), 0,16 µl (8 pmol) Primer reverse (5'-CGGGACTGCATTTCCACTC-3') (TIB MOLBIOL, Berlin, BRD) sowie die errechnete Menge DNA (100 ng) und wurde mit autoklaviertem bidestilliertem Wasser (ddH₂O) auf 20 µl aufgefüllt. Die Proben wurden in den Thermocycler (TRIO-Thermoblock TB 1, BIOMETRA, Göttingen, BRD) gestellt und durchliefen folgendes Programm: Initiale Denaturierung bei 94°C für 2 min, gefolgt von 35 Wiederholungen aus Denaturierung (94°C für 1 min), Annealing (Anlagerung der Primer an die DNA bei 62°C für 1 min) und Elongation (Bildung des neuen DNA-Stranges bei 72°C für 1 min). Danach erfolgten ein letzter Extensionsschritt (72°C für 10 min) und die Abkühlung auf 4°C.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte in TAE-Puffer (<u>T</u>RIS-Essigsäure [Acetic <u>A</u>cid]-<u>E</u>DTA-Puffer, Herstellung s. tabellarischer Anhang) auf einem 1%igem Agarosegel (Herstellung s. tabellarischer Anhang) mittels einer Mini-Horizontal-Elektrophorese-Kammer (Agagel Standard ohne Kühlung, Typ G 45/1, BIOMETRA, Göttingen, BRD). Nach Zusatz von 5 µl Ethidiumbromid zur späteren Sichtbarmachung der Banden wurde das Gel in die horizontale Gelkammer gegossen und ein "Kamm" zum Bilden der Taschen während der sich anschließenden ca. 30minütigen Auspolimerisierung eingesetzt.

Von jeder PCR-Probe wurden jeweils 10 µl mit 2 µl Laufpuffer (6 x Roti®-Load DNA mit Glycerin, Carl Roth®, Karlsruhe, BRD) versetzt und neben einer DNA-Leiter (100 bp DNA Leiter, Rapidozym, Berlin, BRD) zum Größenabgleich der Basenpaare in die Kammern des Gels eingebracht. Die Elektrophorese-Kammer wurde für ca. 30 min an eine Stromquelle bei

einer konstanten Spannung von 100 Volt angeschlossen (Power Pack P25, BIOMETRA, Göttingen, BRD). Anschließend wurden die Banden mit Hilfe eines UV-Schirms (TI1 BIOMETRA, Göttingen, BRD) und einer Kamera (BioDoc® CCD-Camera, BIOMETRA, Göttingen), auf einem Bildschirm (Panasonic, Hamburg, BRD) sichtbar gemacht und über einen Thermodrucker (UP-890CE, Sony, Heerlen, NL) ausgedruckt.

3.2.2.2. Untersuchungen zur Vitalität und Motorik

Die DYT1-Mäuse wurden am 21. LT vom Muttertier abgesetzt, markiert und genotypisiert (Methode s. 3.2.2.1). In einem Alter von ca. zwei Monaten wurden die Tiere erstmals in den Versuchen eingesetzt. Die Vitalität der Tiere wurde über den gesamten Versuchszeitraum durch Kontrolle des Körpergewichts (KGW) an den Versuchstagen sowie durch die Prüfung von neurologischen Reflexen beurteilt und protokolliert. Die Verhaltensuntersuchungen fanden in vom Tageslicht abgeschirmten Versuchsräumen unter Standardbedingungen (320-340 Lux, 24 ± 1°C) in der Zeit von 8:00 bis 13:00 Uhr statt. Die Tiere wurden stets 1 h vor Versuchsbeginn in die Versuchsräume gebracht, damit sie sich an die dort vorherrschenden Bedingungen adaptieren konnten. Die Versuchsapparaturen wurden jeweils vor und zwischen den einzelnen Tieren mittels 70%igem Ethanol gereinigt, um Verhaltenseffekte durch Wahrnehmung des Geruchs von Artgenossen auszuschließen. Die ausgewählten Dosierungen der zu untersuchenden Testsubstanz Pilocarpin richten sich nach Literaturangaben bei Mäusen und werden bei einmaliger Gabe als subkonvulsiv beschrieben (s. Kap. 2.5.3.1.). 15 bis 40 min nach Applikation der Testsubstanz bzw. des Vehikels wurden die Effekte auf das Verhalten und die Motorik transgener DYT1-Mäuse und Wildtyp-Tiere im Rahmen der nachfolgend beschriebenen etablierten Tests näher untersucht und miteinander verglichen. Auf der folgenden Abbildung ist der zeitliche Ablauf der einzelnen durchgeführten Tests an den jeweiligen Versuchstagen schematisch dargestellt:





Abb. 12: Zeitstrahl zum Ablauf der pharmakologischen Verhaltenstests nach Applikation von Pilocarpin bzw. Vehikel. Zwischen dem Rotarod und der Untersuchung der neurologischen Reflexe sowie zwischen dem Wire-hang Test und dem Grip-strength Test wurde den Tieren eine Pause von jeweils 1 min eingeräumt. Der Footprint Test fand stets als letzter Test max. 35 min nach der Injektion statt (modifiziert nach Lange, 2009).

Neurologische Reflexe

Die Vitalität der Tiere wurde im Rahmen der Verhaltenstests anhand von verschiedenen neurologischen Reflexen überprüft. Dabei wurde die Reaktion auf die Reflexe wie folgt bewertet: Ein Reflex galt als normal, wenn eine direkte Reaktion (innerhalb von 1-2 sec) auf den Reiz stattfand, als gestört wurde hingegen ein Reflex angesehen, wenn auf den Reiz mit einiger Verzögerung (mindestens 2-3 sec) reagiert wurde und als fehlend, wenn keine Reaktion innerhalb von 10 sec gezeigt wurde. Der Lidreflex (eye blink) wurde durch das leichte Antippen des Lidrandes mit einem sauberen Wattestäbchen ausgelöst. Durch das Berühren der Ohrmuschel des Tieres, das bei ungestörten Reflexen mit dem Zurückziehen der Ohrmuschel reagiert, wurde die Hautsensibilität (Ohrreflex, ear twitch) überprüft. Leichtes Berühren der Tasthaare diente zur Überprüfung des Tastsinns (Orientierungsreflex, whisker orienting). Gesunde Tiere halten infolgedessen kurz inne und drehen sich teilweise zu der Körperseite, auf der die Tasthaare berührt wurden. Der Haltungsreflex (postural) wurde getestet, indem man die Maus in einen leeren Makrolonkäfig setzte und diesen behutsam hin und her schwenkte. Gesunde Tiere gleichen die Bewegung durch kontrolliertes Gegenstützen aller vier Gliedmaßen aus. Zur Überprüfung des Stellungsreflexes (righting) wurden die Tiere auf den Rücken gedreht, wobei sich gesunde Mäuse direkt nach dem Loslassen wieder in die Bauchlage begeben.

Lokomotorische Aktivität

Der *Activity Cage* gab Aufschluss über die lokomotorische Aktivität und das Erkundungsverhalten der Tiere. Es handelt sich hierbei um eine Box aus durchsichtigen Plexiglas-Wänden (41 x 41 x 33 cm), die es ermöglichte mit Hilfe von Bewegungssensoren in den Außenwänden sowohl die vertikale als auch die horizontale lokomotorische Aktivität der Tiere zu messen (Model 7420,UGO BASILE, Comerio, VA, Italien). Hierfür wurde die Maus in die Mitte der Box gesetzt und die Bewegungsaktivität über einen Zeitraum von 5 min erfasst. Die Infrarotsensoren erfassten die horizontale Bewegungsaktivität (Transitions). Aufgrund eines technischen Defektes wurde die vertikale Aktivität (Rearings) per Hand gezählt.

Des Weiteren wurde bei diesem Test auf die Spontanaktivität sowie Auffälligkeiten in der Motorik wie beispielsweise dystone Bewegungsstörungen, Circling, Ataxien etc. geachtet (s. auch Pilocarpin-Score).



Abb. 13: Activity Cage zur automatischen Messung der lokomotorischen Aktivität. Die horizontale und vertikale Bewegungsaktivität der Maus wird von Infrarotsensoren erfasst und auf dem Display angezeigt. Am Ende der Versuchzeit (5 min) werden die ermittelten Parameter ausgedruckt.

Koordination

Im *Rotarod-Test* wurde bei Mäusen die Fähigkeit bewertet, auf einem rotierenden Stab zu balancieren. Mäuse mit intakter motorischer Koordination können diesen Test über eine längere Versuchsdauer erfolgreich absolvieren. Mäuse mit ausgeprägtem Defizit bezüglich der motorischen Koordinationsfähigkeit haben hingegen Schwierigkeiten auf dem rotierenden Stab zu verbleiben. Zur Untersuchung der Koordination der Tiere wurde ein akzelerierendes Rotarod (Modell 7650, Robert & Jones, UGO BASILE, Comerio, VA, Italien) verwendet. Es besteht aus einer sich drehenden Walze, die durch senkrechte, undurchsichtige Plastikscheiben in fünf gleichgroße Kompartimente unterteilt ist (s. Abb. 14). Unter dem Drehstab befinden sich Kontaktplatten, die mit einem digitalen Sekundenzählwerk verbunden sind. Man setzt das Tier auf den sich drehenden Stab und startet das Sekundenzählwerk. Sobald die Maus beim Herunterfallen den Kippschalter für die

Kontaktplatte berührt, wird die Zeit automatisch gestoppt. In den ersten 60 sec des Versuches haben die Tiere Zeit, sich bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 4 Rotationen pro min (rpm) an die Apparatur zu gewöhnen. Danach wird der Accelerating-Modus Zeitraum eingeschaltet, wobei über einen von 300 sec die Umdrehungsgeschwindigkeit von 4 rmp auf 40 rmp beschleunigt wird. Es wurde die Zeit gemessen, die sich die Maus auf dem Stab halten kann ("Latency to fall"). Nach Ablauf von 300 sec wurde der Versuch spätestens beendet.



Abb. 14: Rotarod zur Überprüfung der Koordinationsfähigkeit. Die Maus wird auf eine sich drehende Walze gesetzt. Sobald sie herunterfällt, löst sie die Kontaktplatte aus und die Zeit wird gestoppt. Auf der Digitalanzeige kann man anschließend die Aufenthaltsdauer ("Latency to fall") in s ablesen.

<u>Muskelkraft</u>

Grip-strength Test

Zur Beurteilung der neuromuskulären Kraft der Vorderpfoten der Tiere wurde ein elektronisches Messgerät ("Grip-strength Meter", Model 47106, UGO BASILE, Comerio, VA, Italien) verwendet (s. Abb. 15). Die Maus wurde vor einen trapezförmigen Metallbügel platziert, den sie beim Zurückziehen reflexartig umgreift, um der ungewollten Rückwärtsbewegung entgegenzuwirken. Übersteigt die nach hinten ziehende Kraft des Untersuchers die Muskelkraft der Maus, lässt diese den Metallbügel los. Diese höchste Muskelkraft der Maus wird von einem elektronischen Kraftmesser aufgenommen und über eine digitale Anzeige angezeigt. Für jede Maus fanden fünf aufeinanderfolgende Messungen statt, deren Ergebnisse gemittelt wurden. Die Einheit der Griffstärke wurde in Gramm (g) angegeben.



Abb. 15: Grip-strength Test zum Messen der neuromuskulären Stärke der Vordergliedmaßen. Die Maus greift beim Zurückziehen reflexartig einen Metallbügel. Übersteigt die nach hinen ziehende Kraft des Untersuchers diejenige der Muskelstärke der Maus, lässt diese den Metallbügel los. Diese höchste Muskelkraft der Maus wird von einem elektronischen Kraftmesser aufgenommen und angezeigt (in g).

Wire-hang Test

Um auch eine Aussage zur neuromuskulären Stärke der Hintergliedmaßen zu treffen, wurde zusätzlich der Wire-hang Test durchgeführt. Hierfür wurde die Maus in die Mitte eines Käfigdeckels (Normtyp III) gesetzt, der an den Rändern mit Klebeband abgedeckt war (freie Innenfläche: 20x15 cm), sodass das Tier während des Tests nicht an den Deckelrand gelangen konnte. Durch sanfte Bewegung des Deckels wurde das Tier dazu gebracht, die Drahtstäbe zu umgreifen. Anschließend wurde der Deckel zunächst für 1 min um 90° und dann für eine weitere Minute um 180° gedreht. Es wurde die Zeit gemessen, die sich die Maus in der jeweiligen Position festhalten konnte ("Latency to fall"). Gesunde Mäuse sind ohne Schwierigkeiten in der Lage, sich über diesen Zeitraum am Drahtgitter festzuhalten. Diese Untersuchung wurde über einer gepolsterten Oberfläche durchgeführt, um mögliche Verletzungen beim Herunterfallen der Tiere zu vermeiden.



Abb. 16: Wire-hang Test zur Messung der neuromuskulären Kraft. Die Maus wurde auf einen an den Rändern abgeklebten Käfigdeckel gesetzt und der Deckel erst um 90°, dann um 180° gedreht. Es wurde die Zeit gemessen, die sich die Maus in der jeweiligen Position am Deckel festhalten konnte.

Ganganalyse

Der *Footprint-Test* dient der Analyse des Ganges der Tiere. Die Vorder- und Hinterpfoten der Maus wurden verschiedenfarbig mit ungiftiger, wasserlöslicher Farbe (Plaka®, Pelikan, Hannover, BRD) markiert. Dann musste die Maus einen blickdichten Tunnel (85 x 5 x 5 cm) durchlaufen, dessen Boden mit Papier ausgelegt war. An den entstandenen Pfotenabdrücken konnten die Schrittlänge der Vorder- und Hinterpfoten, der Abstand der Pfoten der linken und rechten Seite sowie die jeweiligen Abstände der Vorder- bzw. Hinterpfoten (Fußung) jeder Seite ausgemessen werden (s. Abb. 17). Drei vollständige, gut sichtbare Abdrücke wurden für jedes Tier ausgemessen und die Ergebnisse dieser Messungen gemittelt. Dabei blieben die ersten und letzten 7 cm der Laufbahn unberücksichtigt.



Abb. 17: Footprint Test zur Analyse des Gangbildes. Die Maus läuft mit farbig markierten Pfoten (Vorderpfoten rot und Hinterpfoten schwarz) durch einen mit Papier ausgelegten Tunnel (rechtes Bild). An den entstandenen Pfotenabdrücken (linkes Bild) werden die Parameter Schrittlänge der Vorder-(A) und Hinterpfoten (B), jeweils der Abstand zwischen den Vorder- (C) und Hinterpfoten (D) der linken zur rechten Körperseite, sowie der Abstand der Vorder- von der Hinterpfote (Fußung) (E) jeder Körperseite gemessen (Abb. modifiziert nach Lange, 2009).

3.2.2.3. Pharmakologische Manipulation von mAChR im DYT1-Mausmodell

Um einer möglichen funktionellen Relevanz des cholinergen Neurotransmittersystems im DYT1-Mausmodell nachzugehen, wurden - ähnlich wie beim *dt^{sz}*-Hamstermodell - folgende Vorgehensweisen gewählt:

- einmalige systemische i.p. Applikation
- tägliche systemische i.p. Applikation über einen Zeitraum von 21 Tagen
- einmalige intrastriatale Mikroinjektion zur direkten lokalen pharmakologischen Manipulation striataler mAChR

3.2.2.3.1. Einmalige systemische intraperitoneale Applikation

Die akuten systemischen Untersuchungen im DYT1-Mausmodell wurden im sog. "Crossover"-Design durchgeführt. Hierfür wurden eine Gruppe transgener DYT1-Mäuse sowie eine Gruppe von Wildtyp-Tieren gleichermaßen aufgeteilt, wobei die eine Hälfte der Tiere jeder Gruppe die Testsubstanz, die andere Hälfte hingegen das entsprechende Vehikel erhielt. Nach einer 7tägigen Rekonvaleszenzzeit erhielten dann die Tiere, die initial mit der Testsubstanz behandelt wurden, das Vehikel und umgekehrt. Somit stellte jedes Tier seine eigene Vehikelkontrolle dar. Da es sich bei der eingesetzten Testsubstanz Pilocarpin um einen nicht Subtyp-spezifischen AChR-Agonisten handelt, wurde jede der drei eingesetzten Dosierungen in Kombination mit N-Methyl-Scopolamin, einem peripher wirksamen Anticholinergikum verabreicht, um die rein peripheren Wirkungen des Pilocarpins beispielsweise auf das Herz-Kreislauf-System zu minimieren und somit die Belastung für das Versuchstier so weit wie möglich zu reduzieren. Die Substanzen wurden i.p. in einem Injektionsvolumen von 10 ml/kg verabreicht, wobei das N-Methyl-Scopolamin jeweils 1 min der eigentlichen Testsubstanz appliziert wurde. Aufgrund der vor 7tägigen Rekonvaleszenzphase, die der Erholung der Tiere, aber auch einem Wash-out Effekt der Substanz diente, war es möglich, an einem Tier bis zu drei Dosierungen der Substanz zu testen. 15 min nach der jeweiligen Applikation wurde begonnen, die Effekte auf das Verhalten und die Motorik transgener DYT1- und Wildtyp-Mäuse im Rahmen der bereits unter Punkt 3.2.2.2, beschriebenen etablierten Tests näher zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Bei diesem Versuch handelte es sich um einen "Blindversuch", d.h. der Untersucher wusste nicht, mit welcher Lösung das jeweilige Tier behandelt wurde bzw. hatte keine Kenntnis zum genetischen Hintergrund der Tiere.

Für die akut systemischen Versuche wurden insgesamt neun DYT1-Mäuse und zehn Wildtyp-Tiere verwendet.

Pilocarpin-Score

Trotz des Einsatzes von N-Methyl-Scopolamin zur Minderung der rein peripheren Nebenwirkungen war zu erwarten, dass zentrale Nebenwirkungen durch Pilocarpin hervorgerufen werden können bzw. auch periphere nicht komplett unterdrückt werden konnten. Um daher die in der Literatur häufig beschriebenen Nebenwirkungen der Testsubstanz Pilocarpin besser erfassen und beurteilen zu können und somit eine Aussage zur Empfindlichkeit transgener Mäuse gegenüber der Testsubstanz im Vergleich zu Wildtyp-Tieren treffen zu können, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein sogenannter "*Pilocarpin-Score"* etabliert. Dieses Score-System wurde während der pharmakologischen Untersuchungen parallel zu den bereits erläuterten Verhaltens- und Motoriktests erhoben,

wobei ein Großteil der Beobachtungen im Activity Cage gemacht wurde. Der Pilocarpin-Score berücksichtigte die folgenden Parameter:

Hypolokomotion/Akinesie	0 = ungestörtes Explorationsverhalten 1 = Tier verharrt häufig an einer Stelle 2 = Tier bewegt sich nur sporadisch / selten 3 = keine Bewegung
Rigidität der Hintergliedmaßen bzw. Vordergliedmaßen	 0 = nicht vorhanden 1 = nicht permanent einseitig 2 = nicht permanent bilateral bzw. permanent einseitig 3 = permanent bilateral
Ataxie	0 = nicht vorhanden 1 = ggr. verändertes Gangmuster / leichtes Schwanken 2 = mgr. Gleichgewichtsstörung 3 = Verlust des Stellungsreflexes / Umkippen
Salivation	0 = nicht vorhanden 1 = vorhanden

Die Scores der einzelnen Parameter wurden anschließend für jedes Tier addiert, so dass ein individueller Maximalscore von 10 erreicht werden konnte.

3.2.2.3.2. Chronischer Versuch über einen Zeitraum von 21 Tagen

Um die Auswirkungen einer längerfristigen Manipulation des cholinergen Systems im DYT1-Mausmodell zu untersuchen, wurden weitere 10 DYT1-Mäuse und 10 Wildtyp-Tiere über eine Zeitraum von 21 Tagen mit der Testsubstanz behandelt. Hierfür erhielten beide Gruppen 1 x täglich Pilocarpin (100 mg/kg) in Kombination mit N-Methyl-Scopolamin i.p. injiziert. Um Kontrollwerte zu erhalten, wurden die Tiere an Tag 1 der Langzeitbehandlung noch <u>vor</u> der erstmaligen Injektion der Testsubstanz mit Hilfe der bereits beschriebenen Verhaltens- und Motoriktests (s. 3.2.2.2) untersucht. An Tag 7, 14 und 21 der Behandlung wurden die genannten Tests <u>nach</u> Applikation der Testsubstanz wiederholt. Außerdem wurden die durch das Pilocarpin verursachten Nebenwirkungen mit Hilfe des Pilocarpin-Scores an allen vier Testtagen erfasst.

Abb. 18: Zeitlicher Verlauf zu den systemischer	Injektionen über 21	Tage bei DYT1-Mäusen
---	---------------------	----------------------



3.2.2.4. Striatale Mikroinjektionen

3.2.2.4.1. Stereotaktische Implantation der Führungskanülen

DYT1-Mäuse wie auch Wildtyp-Tiere wurden in einem Alter von ca. zwei Monaten stereotaktisch operiert. Da der Ablauf der Implantation vergleichbar mit dem der *dt*^{sz}-Hamster ist (Methode s. Punkt 3.2.1.3), wird im Folgenden lediglich auf die nennenswerten Unterschiede eingegangen. Zur Anästhesie erhielten die Tiere 60 mg/kg KGW Pentobarbital mit einem Injektionsvolumen von 10 ml/kg KGW i.p.. Die Trepanationspunkte wurden in Anlehnung an den Mausatlas nach Paxinos und Watson (2001) und eigenen Vorversuchen mit 0,8 mm anterior und 2,0 mm lateral zu Bregma bestimmt und markiert. Nach Bohrung der Trepanationsstellen und Eindrehen der drei Halteschrauben wurden die beiden Führungskanülen auf 2,6 mm ventral von Bregma abgesenkt.

Zur Schmerzbehandlung wurde den Tieren Carprofen (5 mg/kg) präemptiv eine Stunde vor Operationsbeginn sowie 4-6 h später und darüber hinaus über weitere drei Tage 1x täglich subkutan verabreicht.

3.2.2.4.2. Mikroinjektionstechnik

Bei den DYT1-Mäusen erfolgten die intrastriatalen Mikroinjektionen gleichermaßen wie vorangehend für die *dt*^{sz}-Hamstermutante beschrieben (s. Punkt 3.2.1.3.2.). Im Unterschied zu den Hamstern hatten die Tiere jedoch sowohl post operationem als auch zwischen den einzelnen Substanzapplikationen jeweils eine Ruhephase von 7 Tagen (Rekonvaleszenz bzw. Wash-out-Effekt). DYT1-Mäuse wie auch Wildtyp-Tiere erhielten im Rahmen der Vehikelkontrolle zunächst das Vehikel direkt in das dorsale Striatum appliziert. Im Anschluss an diese erste und einzige Vehikelkontrolle folgte im 7tägigen Abstand die intrastriatale Applikation der Testsubstanz in der jeweiligen Dosierung. Im Gegensatz zu den systemischen Versuchen im DYT1-Mausmodell wurde bei den intrastriatalen Applikation auf eine zusätzliche Gabe von N-Methyl-Scopolamin verzichtet, da die Testsubstanz Pilocarpin hierbei direkt ins Gehirn gegeben wird und daher keine starken peripheren Wirkungen zu erwarten waren. Im Anschluss an die Applikation wurden die Tiere in den bereits beschriebenen Tests zur Vitalität und Motorik näher untersucht und die transgenen mit den Wildtyp-Tieren verglichen. Zur Überprüfung der korrekten Lokalisation der Führungskanülen wurden die Mäuse nach Beendigung der Versuchsreihe perfundiert (s. Punkt 3.2.2.4.3.).

3.2.2.4.3. Perfusion und histologische Untersuchungen zur Bestimmung der Lokalisation der Führungskanülen

Im Anschluss an die pharmakologischen Untersuchungen wurden die Versuchstiere perfundiert, um von den Gehirnen histologische Schnitte für die Auswertung der Lokalisation

der Führungskanülen anfertigen zu können. Der Ablauf der Perfusion und der Gehirnentnahme der Mäuse gleicht dem Vorgehen bei den Hamstern (Methode s. Punkt 3.2.1.3.3.).

Ebenso wie bei den Hamstern wurden lediglich die Tiere in die statistische Auswertung aufgenommen, deren Führungskanülen korrekt lokalisiert waren und deren Schnitte keinerlei Anzeichen einer Infektion aufwiesen.

Für die intrastriatalen Mikroinjektionen wurden insgesamt 20 Mäuse verwendet.

3.2.2.5. Immunhistochemische Untersuchung striataler cholinerger Interneurone bei DYT1-Mäusen

Bei der Markierung und Auszählung der cholinergen Interneurone wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Perfusion der DYT1-Mäuse und Wildtyp-Tiere
- Aufbereitung der Gehirne und Anfertigung der Schnitte
- Immunhistochemische Markierung
- Auszählung cholinerger Interneurone mittels der Bildanalyse

Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten anhand der in unserer Arbeitsgruppe etablierten 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Methode (z.B. Sander, 2004; Sander et al., 2006; Hamann et al., 2006). Für diese Versuche wurden fünf transgene DYT1-Mäuse und sechs Wildtyp-Tiere verwendet. Die Mäuse wurden mittels Pentobarbital (100 mg/kg i.p.) in tiefe Narkose gelegt und anschließend transkardial erst mit 0,01 M phosphatgepufferter NaCl-Lösung und danach mit 4%igem Paraformaldehyd perfundiert (Herstellung s. tabellarischer Anhang, Methode unter Punkt 3.2.1.3.3. beschrieben). Die Gehirne wurden entnommen und in Anlehnung an frühere Studien (Nobrega et al., 1999; Hamann et al., 2006) über Nacht in 4% igem phosphatgepuffertem Paraformaldehyd aufbewahrt, um eine gleichmäßige Fixierung des Gehirngewebes und somit eine homogene Markierung der Neurone bei der anschließenden Immunhistochemie gewährleisten zu können. Im Anschluss erfolgte zur Kryoprotektion eine Aufbewahrung der Gehirne in einer 30% igen phosphatgepufferten Zuckerlösung bei 4°C über einen Zeitraum von mindestens zwei Tagen. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden von den Gehirnen mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Fa. MICROM, Walldorf, BRD) jeweils 40 µm dicke Transversalschnitte in drei Serien angefertigt, wobei die Hirnschnitte von transgenen Tieren und Wildtyp-Mäusen gleichermaßen und zeitgleich behandelt wurden. Die weitere Lagerung der Gehirnschnitte erfolgte bei -80°C in einem speziellen Gefriermedium (s. tabellarischer Anhang).

Eine Serie wurde für die Markierung der cholinergen Interneurone verwendet und zur Übersicht wie folgt aufgearbeitet:

- Inkubation der Schnitte mit 2%igem H₂O₂
- Inkubation mit einer "Blocking"-Lösung zur Reduktion unspezifischer Markierungen
- Inkubation mit dem primären Antikörper (Ak) (bindet direkt an ChAT)
- Inkubation mit dem sekundären Ak (bindet an den primären Ak)
- Inkubation mit dem Enzym Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (zur Umsetzung der Farbreaktion)
- Vorinkubation mit DAB (Farbreagenz)
- Zugabe von H₂O₂ (Substrat f
 ür Meerrettich-Peroxidase: DAB wird umgesetzt und sichtbar)

Nach dem Entnehmen der Gehirnschnitte aus dem Gefriermedium wurden diese in 0,1 M Phosphatpuffer aufgefangen (pH 7,4) und anschließend dreimal in TRIS-gepufferter isotoner NaCI-Lösung (TBS = tris-buffered saline; pH 7,6; Herstellung s. tabellarischer Anhang) für 10 min gewaschen. Diese "Reinigung" erfolgte zwischen allen Vorgängen und wird im Folgenden nicht weiter explizit erwähnt.

Zuerst wurden die Schnitte über einen Zeitraum von 30 min in 5 ml TBS unter Zusatz von 75 ul H₂O₂ vorinkubiert, um eventuell vorhandene Blutrückstände zu beseitigen. Die anschließende Inkubation in 2 ml der "Blocking-Lösung" (Herstellung s. Anhang) erfolgte für 60 min. Zweck dieser Lösung ist es, unspezifische Bindungen des primären Ak zu reduzieren. Danach konnten die Schnitte mit dem primären Ak (Anti-Cholin-Acetyltransferase aus Kaninchen IgG [ChAT] 1:1000, Chemicon, Temecula, CA, USA) versetzt und über einen Zeitraum von 20 h bei RT inkubiert werden. Anschließend wurden die Gehirnschnitte über 60 min mit dem biotinylierten sekundären Ak (Schwein-anti-Kaninchen IgG [bPaR] 1:500, DAKO, Hamburg, BRD) inkubiert. Um eine ausreichende Umspülung der Präparate zu gewährleisten, erfolgten die Inkubationen im primären und sekundären Ak in einer sog. "Carrierlösung" (Herstellung s. Anhang). Der anschließende Zusatz des Enzyms Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (8 µl auf 3 ml TBS) erfolgte für 60 min. Die Vorinkubation mit dem Nickel-versetzten 3,3'-Diaminobenzidin (=DAB, in Form einer DAB-Lösung, Herstellung s. Anhang) benötigte 15 min; die Farbreaktion wurde im Anschluss durch die direkte Zugabe von 1 μ l H₂O₂ pro 4 ml DAB-Lösung umgesetzt. Die Gehirnschnitte verblieben weitere 15 min in der Lösung, um abschließend nochmals dreimal in TBS gewaschen zu werden.

Nach der immunhistochemischen Markierung wurden die Schnitte nach anterior-posterior-Ebene sortiert, mit einer Gelatine-Lösung auf entfettete Objektträger gezogen und anschließend mit Hilfe von Entellan® eingedeckt.

Zählung der striatalen cholinergen Interneurone

Die Zählung der striatalen cholinergen Interneurone erfolgte mittels eines Bildanalysesystems (Fa. Visitron Systems GmbH, Puchheim, BRD), welches die durch ein Mikroskop (Fa Zeiss, Jena, BRD) vergrößerten und über eine Kamera (Spot RT Slider) aufgenommenen Gehirnschnitte auf den Monitor eines Computers projizierte.

Zunächst wurde das Striatum anhand des stereotaktischen Atlas für das Mäusegehirn (Franklin und Paxinos, 2008) in eine anteriore (1,8 mm bis 1,0 mm), eine mediale (1,1 mm bis 0,1 mm) und eine posteriore (0,1 mm bis 0,7 mm) Region unterteilt. Der mediale Bereich des Striatums wurde zusätzlich in ein dorsomediales, dorsolaterales, ventromediales und ventrolaterales Striatum differenziert (s. Abb. 11). Diese Einteilung erfolgte in Anlehnung an frühere Untersuchungen, die zeigten, dass zwischen diesen Gehirnregionen Unterschiede bezüglich der Morphologie und Neurochemie existieren (Gernert et al., 2000; Richter und Löscher, 1998). So gibt es Unterschiede zwischen dem dorsalen und dem ventralen Teil des Striatums bezüglich der Signalwege: Während der sensomotorische Kortex vornehmlich in Richtung des dorsalen Striatums projiziert, erhält das ventrale Striatum seine Afferenzen aus dem limbischen und paralimbischen Kortex, der Hippocampus-Formation sowie der Amygdala (Middleton und Strick, 2000; Nakano et al., 2000). Darüber hinaus ergaben frühere Studien zu striatalen Interneuronen bei Nagern einen rostro-kaudalen sowie einen medio-lateralen Verteilungsgradienten (Hamann et al., 2006; Schlösser et al., 1999; van Vulpen und van der Kooy, 1998). Für die Quantifizierung der cholinergen Interneurone wurde aus beiden Gehirnhälften jeden Schnittes ein Bildausschnitt pro Subregion ausgezählt. Dies erfolgte bei einer 400-fachen Vergrößerung (Okular: 10-fach, Objektiv: 40-fach) unter Fokussierung der Neurone in den unterschiedlichen Bildebenen. Die ausgezählten cholinergen Interneurone konnten anschließend auf ihre striatale Dichte umgerechnet werden. Dies erfolgte mittels einer Formel, welche durch die Messung der Flächen der ausgezählten Bildausschnitte und der bekannten Schnittdicke (40 µm) wie folgt erstellt wurde:

Dichte = Anzahl gezählte Neurone / mm³

- = Anzahl gezählte Neurone / Schnittdicke [mm] x Bildbreite [mm] x Bildhöhe [mm]
- = Anzahl gezählte Neurone / 0,04 mm x 0,296 mm x 0,222 mm
- = Anzahl gezählte Neurone / 0,00263 mm³
- = (Anzahl gezählte Neurone x 380,23) / mm³

Die Objektträger wurden vor der Auszählung verschlüsselt, um zu vermeiden, dass der Untersucher Kenntnis darüber hatte, ob es sich um Schnitte von transgenen Tieren bzw. Wildtyp-Tieren handelte. Erst nach Ermittlung aller Werte wurden die Schnitte entschlüsselt und es erfolgte die Zuordnung zu den jeweiligen Tiergruppen.

3.2.2.6. Westernblot-Analyse der Cholinacetyltransferase

Zum Nachweis der Expression der Cholinacetyltransferase (ChAT) wurde das Westernblot-Verfahren angewandt. ChAT ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Biosynthese des ACh und wird häufig als zuverlässiger Marker für cholinerge Aktivität eingesetzt. Bei diesem Verfahren ist man wie folgt vorgegangen:

- Präparation und Aufbereitung der Gehirne
- Auftrennung der Proben mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page, engl.: <u>s</u>odium <u>d</u>odecyl <u>s</u>ulfate <u>polya</u>crylamide <u>g</u>el <u>e</u>lectrophoresis)
- Blotting der Proteinbanden auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-)Membran
- Immunodetektion mittels primärem und sekundärem Ak
- Auswertung des Westernblots mit Hilfe eines Imaging-Systems
- Ladekontrolle nach Stripping

Hierfür wurden Gehirne von fünf transgenen DYT1-Mäusen sowie fünf Wildtyp-Tieren verwendet. Die Expressionsanalyse der ChAT erfolgte im Kortex, Striatum, Cerebellum und Hirnstamm. Diese Gehirnareale wurden mittels eines sterilen Skalpells freipräpariert und in flüssigem Stickstoff konserviert. Anschließend wurden die einzelnen Präparate in Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER®, Pierce Biotechnology, Rockford, USA), das zusätzlich mit einem Protease-Inhibitor (complete MINI Protease Inhibitor Cocktail tablets, Roche Applied Science, Mannheim, BRD) versetzt war, homogenisiert. Die Homogenate wurden zentrifugiert und der Überstand bei -80°C gelagert.

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe eines Protein-Assay-Kits (Pierce® BCA [bicinchoninic acid] Protein Assay kit, Pierce Biotechnology, Rockford, USA) bestimmt. Die Analysen wurden nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Zu 1 ml Assay-Lösung wurden 50 µl Proteinlösung unterschiedlicher Verdünnung (1:20, 1:50) gegeben, 30 min bei 37°C inkubiert und die Extinktion bei λ = 562 nm mittels eines Photometers (Biowave S 2100, Biochrom, Cambridge, UK) gegen einen proteinfreien Blindwert bestimmt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand einer parallel dazu mit Rinderserumalbumin (im Pierce® BCA Protein-Assay-Kit enthalten) angesetzten Eichkurve ermittelt.

Gelelektrophorese / SDS-Page

Zur Auftrennung der einzelnen Proteine wurden jeweils 30 µg der Homogenate auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel (Fertiggel, Typ TRIS-Glycin-SDS, anamed Elekrophorese GmbH, Groß-Bieberau, BRD) aufgetragen. Außerdem wurde ein Marker (Precision Plus Proteintm Dual Color Standards, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) zur Größenbestimmung der Proteine während der Auftrennung aufgetragen. Das im Gel enthaltene SDS ist ein anionisches Detergenz, sodass es sich hierbei um ein denaturierendes Verfahren handelt. Die Gelelektrophorese erfolgte mittels einer Mini-Vertikal-Doppel-Elektrophorese-Kammer von Carl Roth® (Karlsruhe, BRD). Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Laemmli-Lysis-Puffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD) versetzt und 5 min bei 100°C denaturiert. Die Elektrophorese-Kammer wurde an einen Stromverteiler (Power Pack P25, BIOMETRA, Göttingen, BRD) angeschlossen und eine konstante Spannung von 125 V für ca. 100 min angelegt. Die Gelelektrophorese wurde beendet, wenn die 25 kDa Bande des Markers die untere Kante des Gels erreicht hatte.

<u>Blotting</u>

Nach der Auftrennung des Proteingemisches erfolgte das Aufbringen der Polypeptidbanden auf einen Träger. Als Trägerfolie diente hierfür eine PVDF-Membran (Amersham Hybond-P PVDF Membran, GE-Healthcare, Freiburg, BRD). Nachdem das Gel und die Membran in Transferpuffer (Herstellung s. Anhang) äquilibriert wurden, wurde die Blotting-Kassette in einer Schale mit Transferpuffer folgendermaßen zusammengebaut:

Kathode (-) Schwarze Seite der Transferkassette 6 mm Schwamm 1 x Filterpapier Gel PVDF-Membran 1 x Filterpapier 3 mm Schwamm Graue Seite der Transferkassette Anode (+) +

Die Blotting-Kassette wurde anschließend in eine mit Transferpuffer gefüllte Tankapparatur (Hoefer[™] mighty small transphor unit) überführt. Ein Wasserbad (Haake Wasserbad B3 mit digitalem Einhängethermostat D1), das über ein Schlauchsystem mit der Blotting-Kammer verbunden war und mit Hilfe von Eiswasser durchgehend auf eine Temperatur von ca. 10°C gekühlt wurde, diente als Kühlvorrichtung während des Blotting-Vorganges. Es wurde eine elektrische Spannung von 100 V senkrecht zur Laufrichtung des Gels angelegt, sodass die

Proteinbanden innerhalb einer Stunde aus dem Gel heraus wanderten und auf die Membran gelangten. Das Muster der getrennten Proteinbanden blieb dabei erhalten.

Ponceau S-Färbung

Nach dem Blotten wurde die Membran zur Kontrolle der Proteinübertragung für 5 min in Ponceau S-Färbelösung (Ponceau S Solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD) gefärbt. Nach mehrmaligem Spülen mit einer 1%igen Essigsäure zur Reduzierung des Hintergrundes wurden das Proteinmuster und der Marker sichtbar. Anschließend wurde die Membran bei 4°C in TBS-Tween (TBST)-Puffer (Herstellung s. Anhang) gelagert oder direkt für die Immunodetektion verwendet.

Coomassie-Färbung

Um festzustellen, wie viel Protein nach dem Blotting-Vorgang auf dem Gel verblieben ist, wurde das Gel für ca. 15-30 min mit Coomassie-Färbelösung (Herstellung s. Anhang) angefärbt. Es folgte das Entfärben des Gels mit einer speziellen Entfärbelösung (Herstellung s. Anhang) bei langsamem Schwenken über Nacht. Am nächsten Tag konnte das Bandenmuster der verbliebenen Proteine beurteilt werden.

Immunodetektion

Der Nachweis der ChAT mit spezifischen Antikörpern erfolgte zur Übersicht in folgenden Schritten:

- Aktivierung der Membran
- Inkubation mit einer "Blocking"-Lösung zur Reduktion unspezifischer Bindungsstellen
- Inkubation mit dem primären Ak (bindet direkt an ChAT)
- Inkubation mit dem sekundären Ak (bindet an den primären Ak)

Die durch das Blotten auf die Membran übertragenen Proteine lassen sich mit Hilfe spezifischer Antikörper nachweisen. Zur Aktivierung wurde die Membran zunächst für 10 sec in Methanol und danach für 5 min in Aqua dest. geschwenkt. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Blocking Reagenz (Amersham ECL blocking agent, GE Healthcare, Freiburg, BRD) 1 h bei RT unter ständigem Schütteln inkubiert, gefolgt von einem kurzen Waschvorgang in TBST-Puffer. Danach konnte die Membran mit dem Primär-Ak (Anti-Cholin-Acetyltransferase polyklonaler Ak aus Kaninchen IgG **[ChAT]** 1:4000 in TBST, Thermo Scientific, Pierce Antibodies, Rockford, USA) versetzt werden und für 1 h bei RT inkubieren. Nachfolgend wurde die Membran unter sechsmaligem Wechseln des TBST-Puffers gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Zweit-Ak in einer Konzentration von 1:20000 in TBST (Amersham ECL anti-Kaninchen IgG,

Meerrettich-Peroxidase verbundener Spezies-spezifischer Ak vom Esel, GE Healthcare, Freiburg, BRD) für 1 h bei RT. Die Immunodetektion wurde schließlich mit einem letzten Waschvorgang (sechsmaliger Pufferwechsel) abgeschlossen.

Auswertung des Westernblots mit Hilfe eines Imaging-Systems

Die Detektion des Immunkomplexes erfolgte durch das "enhanced chemiluminescence system" (ECL) (Amersham[™] ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare Freiburg, BRD). Dabei kommt es zur Reaktion des durch die Peroxidase frei gewordenen Sauerstoffradikals mit Luminol, welches hierdurch in einen angeregten Zustand übergeht. Anschließend wird Licht (428 nm) unter Energieverlust abgestrahlt, wobei ein Phenolderivat als Verstärker (Enhancer) der Lichtemission dient. Auf diese Weise entstehen Verschattungen bei der Exposition eines Röntgenfilms (Müller, 2004). Die Detektion der Lichtemission erfolgte in einer Dunkelkammer auf einem Hyperfilm[™] ECL (Amersham-Biosciences, GE Healthcare, Freiburg).

Ladekontrolle nach Stripping

Nach Detektion der ChAT wurde der Antigen-Antikörper-Komplex mit Hilfe einer sog. "Stripping-Lösung" (Herstellung s. tabellarischer Anhang) abgelöst (stripping), um im Anschluss eine Immunoblot-Analyse derselben Membran mit dem β -Actin-Ak (Actin beta/ACTB **[** β -Actin**]** 1:1200, Acris Antibodies GmbH, Herford, BRD) durchzuführen. Hierfür wurde die Membran zunächst mit dem in TBST gelösten primären Ak β -Actin versetzt und für 2 h bei RT inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit TBST erfolgte erneut die Inkubation der Membran mit dem bereits erwähnten sekundären Ak für eine weitere Stunde bei RT. Im Anschluss an einen letzten Waschvorgang erfolgte die Detektion des β -Actin mit Hilfe des ECL-Systems in der Dunkelkammer. Mit dieser Vorgehensweise wird eine gleichmäßige Auftragung der Proteinmengen in allen Taschen des Gels gewährleistet ("Ladekontrolle"). Ladekontrollen, oft auch als "housekeeping genes" bezeichnet, sind Proteine, die in fast allen Geweben und Zellen auf einem hohen Niveau auch unter sehr verschiedenen Bedingungen konstant exprimiert werden, so dass die Menge an Ladekontrollprotein in allen Proben vergleichbar hoch ist und somit Rückschlüsse auf die Menge des zu untersuchenden Proteins möglich sind.

3.3. Statistische Versuchsauswertung

3.3.1. Untersuchungen im *dt^{sz}*-Hamster

3.3.1.1. Pharmakologische Manipulationen beim dtsz-Hamster

Bei allen Versuchen wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit α (Signifikanzniveau), bei deren Unterschreitung die Nullhypothese als widerlegt angenommen wird, mit α = 0,05 festgesetzt. Mit Hilfe der Software SigmaStat® (Version 3.0.) wurde der p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit) berechnet. Eine Signifikanz lag vor, wenn $p < \alpha$ war. Bei p-Werten von 0,05 < p < 0,1 wurde von einer Tendenz gesprochen. Die Qualität der Aussage wurde umso höher angesehen, je kleiner die p-Werte waren. Die dazugehörigen Abbildungen wurden mit SigmaPlot® (Version 8.0) erstellt.

Für die Auswertung der einmaligen systemischen Applikationen sowie der Mikroinjektionen wurde in den verschiedenen Tiergruppen das arithmetische Mittel (M.W.) mit der Standardabweichung (S.D.) und dem Standardfehler (S.E.) aus den maximal erreichten Schweregraden der Dystonie jeweils für die erste, zweite und dritte Stunde ermittelt. Unter der Voraussetzung, dass keine Normalverteilung vorliegt, erfolgte für die statistische Auswertung die Berechnung signifikanter Veränderungen im Schweregrad der Dystonie zwischen den Vehikelkontrollen (Vor- und Nachkontrolle) und der Substanzapplikation, indem zunächst die Friedman-Varianzanalyse (signifikant bei p < 0,05) durchgeführt wurde. Bei entsprechender Signifikanz wurde zusätzlich der einseitige Wilcoxon-Test (signifikant bei p < 0,05) herangezogen. Dabei wurden die maximal erreichten Schweregrade der Vor- bzw. Nachkontrolle mit denen der Substanzapplikation verglichen. Die Latenzzeiten bis zum ersten Auftreten dystoner Bewegungsstörungen ("Latency on") wurden ebenfalls nach demselben Prinzip statistisch ausgewertet. Die Latenzzeiten bis zum Einsetzen des Stadiums 6 ("Latency max") konnten hingegen nicht ausgewertet werden, da die Voraussetzung, dass pro Tiergruppe mindestens fünf Tiere das Stadium 6 sowohl in beiden Vehikelkontrollen als auch unter Substanzgabe aufweisen, bei keinem der applizierten Wirkstoffe erfüllt wurde. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse in Anlehnung an frühere Arbeiten (Hamann, 2000; Sander, 2004) in Form von Balkendiagrammen mit M.W. und S.E. dargestellt.

Für den Vergleich der substanz- und der vehikelbehandelten *dt^{sz}*-Hamster im Rahmen der Langzeitbehandlung über 21 Tage wurden zwei verschiedene Vorgehensweisen gewählt. Zunächst wurde der M.W., die S.D. und der S.E. sowohl der Dystonie-Schwergrade als auch der Latency on für jeden Testtag mit Hilfe einer Tabellenkalkulation berechnet. Im Anschluss wurde eine Varianzanalyse für unverbundene nicht-parametrische Daten (Kruskal-Wallis-Test) mit nachfolgendem Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der Tiergruppen an den einzelnen Testtagen durchgeführt. Zum anderen wurde die Area under the curve (AUC) für
jedes einzelne Tier sowohl für den Dystonieschweregrad als auch für die Latency on über den gesamten Verlauf bis zum 59. bzw. 60. Lebenstag sowie in Intervallen gestaffelt berechnet. Diese Zeitintervalle wurden wie folgt festgelegt: 22. bis 31. LT [Phase nach Absetzen], 32. bis 42. LT [MAX-Phase], 43. bis 50. und 51. bis 60. LT [jeweils vier Testtage während der Verlaufskontrolle] bzw. 22. bis 42. LT [Substanzgabe] und 43. bis 59./60. LT [Verlaufskontrolle]. Es wurden wiederum der M.W., S.E., und S.D. aus den Einzelwerten berechnet, um die Gruppen anschließend mit einem ungepaarten t-Test vergleichen zu können.

3.3.1.2. Rezeptorautoradiographische Untersuchungen im *dtsz*-Hamstermodell

Für die Auswertung der rezeptorautoradiographischen Analysen der Bindungsaffinitäten sowie der Dichte mAChR vom Subtyp M1 sowie M2/M4 wurden zunächst der M.W. sowie der S.E. für die beiden Versuchsgruppen ermittelt. Im Anschluss wurde eine one-way ANOVA mit anschließendem Student's t-Test als post-hoc-Verfahren zum Vergleich der einzelnen Gehirnregionen zwischen dt^{sz} -Hamstern und Kontrolltieren durchgeführt. Das Gesamtnivau α wurde im Rahmen dieser Untersuchungen erneut mit 5% festgesetzt. Des Weiteren wurden die Testverfahren um die Bonferroni-Holm-Korrektur der p-Werte ergänzt, um einer möglichen α -Fehler-Kumulierung infolge multiplen Testens innerhalb einer Stichprobe entgegenzuwirken. Hierbei ergab sich für die rezeptorautoradiographische Untersuchung der M1-Rezeptoren ein korrigiertes Signifikanzniveau von α =0,0015 bzw. α =0,0017 für die M2/M4 Rezeptoren. Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Programms Sigma-Plot® (Version 11.0) durchgeführt.

3.3.2. Untersuchungen im DYT1-Mausmodell

3.3.2.1. Pharmakologische Manipulationen im DYT1-Mausmodell

Da die Daten dieser Untersuchungen nicht normalverteilt waren, wurden für die Auswertung lediglich parametrische statistische Testverfahren nicht angewendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α wurde in diesem Versuch ebenfalls mit α = 0,05 festgelegt, p-Werte von 0,05 < p < 0,1 wurden als Tendenz gewertet. Für die Auswertung wurden die Einzeltierwerte herangezogen. Die p-Werte wurden mit dem Programm SigmaStat® (Version 3.0) errechnet, die Darstellung der dazugehörigen Abbildungen erfolgte mit dem Programm SigmaPlot® (Version 11.0). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse in Anlehnung an eine frühere Arbeit (Lange, 2009) in Form sog. "Boxplots" (Median mit 25./75. Perzentile und Whisker 10./90. Perzentile) dargestellt. Zusätzlich sind das arithmetische Mittel (M.W.) als gestrichelte Linie und Ausreißer als schwarze Punkte (•) abgebildet.

Im Rahmen der einmaligen systemischen Applikationen und Mikroinjektionen wurden Unterschiede zwischen Substanz- und Vehikelbehandlung *innerhalb* der Wildtyp- bzw.

DYT1-Gruppe mit dem Wilcoxon-Signed-Rank-Test ermittelt. Der Gruppenvergleich *zwischen* Wildtyp- und DYT1-Mäusen fand anschließend mit dem Mann-Whitney-U-Test statt.

Bei der systemischen Applikation von Pilocarpin über einen Zeitraum von 21 Tagen wurde hingegen zunächst *innerhalb* der einzelnen Tier- bzw. Behandlungsgruppen mit der Friedman-Varianzanalyse getestet, ob es Unterschiede im Versuchsverlauf gab. Zeigten sich hierbei signifikante Unterschiede, wurden die einzelnen Versuchstage unter Substanzgabe jeweils auf Unterschiede zur Vehikelkontrolle an Tag 1 mit dem Wilcoxon-Signed-Rank-Test überprüft. An den einzelnen Versuchstagen sowie für die zusammengefassten Werte der Zeitspanne zwischen Tag 7 und Tag 21 wurde mittels Mann-Whitney-U-Test außerdem ermittelt, ob es Unterschiede *zwischen* den Wildtyp- und den DYT1-Mäusen gab. Zum Vergleich der beiden Tiergruppen über die gesamte Behandlungsdauer von 21 Tagen erfolgte ferner die Ermittlung der AUC mit anschließendem Student's t-Test. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei den chronisch systemischen Versuchen eine abweichende Abbildungsart gewählt. Da sich in diesen Untersuchungen der M.W. nicht stark vom Median unterschied, wurden in diesen Abb. lediglich der M.W. und der S.E. dargestellt.

3.3.2.2. Immunhistochemische Untersuchungen

Nach der Auszählung der cholinergen Interneurone konnte die Verschlüsselung der Objektträger aufgelöst und die Gehirnschnitte den entsprechenden Tiergruppen (DYT1-Mäuse oder Wildtyp-Tiere) zugeordnet werden. Von den Werten der protokollierten Auszählungen wurden pro Tier und Gehirnhälfte je Region der M.W. mit S.E. und S.D. ermittelt. Anschließend wurden jeweils von den DYT1-Mäusen und von den Wildtyp-Tieren alle M.W. der rechten Gehirnhälfte mit denen der linken Gehirnhälfte mittels des gepaarten t-Testes (für verbundene Stichproben) verglichen. Da in beiden Tiergruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen rechter und linker Gehirnhälfte auftraten, flossen jeweils die M.W. beider Gehirnhälften in die nachfolgenden Auswertungen mit ein. Die Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den DYT1- und den Wildtyp-Mäusen erfolgten mittels eines einseitigen t-Testes für unverbundene Stichproben (Student's t-Test, signifikant bei p<0,05). Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms SigmaStat® (Version 3.0) durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1. *dt^{sz}*-Hamster

4.1.1. Pharmakologische Manipulation von mAChR im *dt^{sz}*-Hamster

Ziel der pharmakologischen Untersuchungen war es, einerseits die Bedeutung des cholinergen Neurotransmittersystems in der Pathophysiologie primärer Dystonien näher zu beleuchten und andererseits eine mögliche Therapieverbesserung mit einer stärkeren antidystonen Wirksamkeit bei gleichzeitiger Reduktion von Nebenwirkungen zu überprüfen.

Wie in Kapitel 3.2. näher erläutert, wurde bei dtsz-Hamstern und Kontrolltieren für die systemischen Manipulationen zunächst die "triple stimulation technique" (s. Punkt 3.2.1.1.) durchgeführt, um bei der Mutante dystone Bewegungsstörungen zu induzieren. Bei den lokalen striatalen Mikroinjektionen wurde entsprechend Punkt 3.2.1.3. vorgegangen. Bei der einmaligen systemischen Applikation sowie den striatalen Mikroinjektionen wurden die Tiere i.d.R. zwischen dem 30. und dem 42. LT, also der Phase der höchsten Dystonieausprägung (MAX-Phase), untersucht. Bei der chronisch systemischen Untersuchung hingegen wurde die jeweilige Substanz bereits ab dem 22. LT täglich über einen Zeitraum von 21 Tagen verabreicht und anschließend mit der Applikation von NaCl bis zum ca. 59 bzw. 60. LT zur Überprüfung eines möglichen Rebound-Effektes nach Absetzen der Substanz fortgeführt. Für die Auswertung der antidystonen Wirkung der eingesetzten Anticholinergika wurden die maximal erreichten Schweregrade der ersten, zweiten und dritten Stunde mit denen der Vorund Nachkontrolle verglichen, um eine Aussage über die Progression der Dystonieausprägung treffen zu können. Des Weiteren wurden die Latenzzeiten bis zum Auftreten der verschiedenen Stadien zur Beurteilung des Verlaufs mit und ohne Substanzapplikation sowie des Beginns und der Dauer dystoner Episoden zur Auswertung herangezogen. Hier wurde v.a. auf die Latency on, also den Zeitraum bis zum Auftreten erster eindeutiger dystoner Bewegungsstörungen (Stadium 2) Wert gelegt.

Der in früheren Studien beschriebene altersabhängige Dystonieverlauf (Richter und Löscher, 1998) (s. Punkt 2.4.1.1.1. und Punkt 3.2.1.1.) konnte in eigenen Versuchen größtenteils bestätigt werden. Bei einigen Tieren zeigte sich jedoch eine Tendenz zur verzögerten Spontanremission der Dystonie, die zuvor bereits von Rehders (1999) bei einigen Würfen beobachtet worden war. Aufgrund dieser individuellen Unterschiede in der Dystonieausprägung konnten diese Hamster teilweise sogar bis zum 44. LT, also noch nach Ablauf der MAX-Phase, in den Versuchen eingesetzt werden.

Insgesamt wurden 113 Hamster, d.h. 25 für akute systemische Injektionen, 44 für Mikroinjektionen und 44 für chronische Untersuchungen, in den Versuchen eingesetzt. Von den 44 operierten Hamstern gingen ein Tier (0,4 %) aufgrund fehlerhafter Lokalisation und neun Tiere (4,0%) infolge einer Infektion nicht in die statistische Auswertung mit ein. Acht Hamster (fünf im Rahmen der Mikroinjektionen, drei bei den akuten systemischen Injektionen) konnten nicht ausgewertet werden, da diese Tiere in der Vor- und Nachkontrolle der 3. Beobachtungsstunde einen Unterschied von mehr als zwei Scores aufwiesen. Zwei Tiere bei den akuten systemischen Injektionen, die bereits vor der Injektion dystone Bewegungsstörungen zeigten, wurden ebenfalls nicht in die statistische Auswertung einbezogen.

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse für die einzelnen Wirkstoffe nach systemischer bzw. lokaler striataler Applikation auf den Schweregrad der Dystonie sowie deren Einfluss auf die Latency on dargestellt. Die Einzeldaten der jeweiligen Versuchstiere zum Schweregrad der Dystonie und der Latenz sind in den Tabellen im Anhang aufgeführt.

4.1.1.1. Systemisch akuter Versuch

Zwar zeigen bisher eingesetzte M1-Anticholinergika wie Trihexyphenidyl eine gewisse Wirksamkeit in der Behandlung von Dystonien, sie sind jedoch mit einer Vielzahl schwerwiegender Nebenwirkungen behaftet. Seit Kurzem gibt es zunehmend Erkenntnisse, dass auch Antagonisten an mAChR vom Subtyp 4 eine potenzielle Wirksamkeit in der Dystonie-Therapie mit einer geringeren Inzidenz an Nebenwirkungen erzielen könnten. In vorangehenden Untersuchungen (Smiljanic, 2010) zeigte der M4-Rezeptor-Antagonist Tropicamid zwar keine signifikanten Effekte auf den Schweregrad dystoner Episoden, jedoch konnte eine deutliche Verzögerung der Latency on beobachtet werden. Daher sollte untersucht werden, ob durch die einmalige systemische Verabreichung des relativ selektiven M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid *in Kombination* mit Trihexyphenidyl ein effektiveres Wirkungs- bei einem gleichzeitig abgeschwächten Nebenwirkungsprofil erreicht werden kann.

Durch die systemische Gabe des M1-Rezeptor-Antagonisten Pirenzepin, der nicht die Blut-Hirn-Schranke passiert, sollte außerdem geklärt werden, ob die antidystonen Effekte der in der Dystonie-Therapie bisher eingesetzten anticholinergen Substanzen möglicherweise auf peripheren Effekten, insbesondere über präsynaptische mAChR1 an Motoneuronen, beruhen.

4.1.1.1.1 Einmalige systemische Applikation von Tropicamid in Kombination mit Trihexyphenidyl

In diesem Versuch wurde drei Gruppen von *dt^{sz}*-Hamstern eine Kombination aus dem M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid und dem M1-Rezeptor-Antagonisten Trihexyphenidyl in den folgenden Dosierungen i.p. verabreicht: 15 mg/kg + 10 mg/kg (n=6), 30 mg/kg + 15 mg/kg (n=6) oder 60 mg/kg + 30 mg/kg (n=8). Die Wirkungen der unterschiedlichen Dosierungen der Kombination aus Tropicamid und Trihexyphenidyl sind in Abb. 19 dargestellt.

Die Gabe der niedrigsten Dosierung (15 mg/kg + 10 mg/kg) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Dystonieschwere. Hier zeigte sich lediglich eine Tendenz zur Verbesserung der dystonen Bewegungsstörungen in der zweiten Beobachtungsstunde (2. Std. p=0,052). Mit der mittleren Dosierung (30 mg/kg + 15 mg/kg) konnte hingegen eine signifikante Reduktion des Schweregrads der Dystonie in der zweiten und dritten Beobachtungsstunde erzielt werden. Nach Verabreichung der höchsten Dosis (60 mg/kg + 30 mg/kg) konnten unerwarteterweise keine antidystonen Effekte ausgelöst werden (s. Abb. 19).

Wie in Tab. 8 ersichtlich, blieb die Latency on, also die Zeitspanne bis zum Auftreten erster eindeutiger dystoner Bewegungsstörungen, nach Applikation der niedrigsten Dosierung unverändert. Nach Injektion von 30 mg/kg Tropicamid und 15 mg/kg Trihexyphenidyl bzw. der höchsten Dosierung von 60 mg/kg Tropicamid und 30 mg/kg Trihexyphenidyl jedoch war das Auftreten dystoner Episoden im Vergleich zur Vor- und Nachkontrolle bei den *dt*^{sz}-Hamstern signifikant verzögert.

Nach kombinierter Gabe von Tropicamid und Trihexyphenidyl trat bei allen Tieren der niedrigsten Dosierung (15+10 mg/kg Tropicamid + Trihexyphenidyl) während der ersten Beobachtungsstunde eine geringgradige Ataxie auf. Des Weiteren zeigten die Hamster von der 20. bis zur 50. min nach Verabreichung der mittleren Dosis (30+15 mg/kg Tropicamid + Trihexyphenidyl) eine gering- bis mittelgradige Hypolokomotion, gefolgt von einer moderaten Hyperaktivität der Tiere (von der 55. bis zur 180. min). Nach Gabe der niedrigsten bzw. höchsten Dosierung (60+30 mg/kg) von Tropicamid und Trihexyphenidyl war eine mittelgradige Hyperaktivität der Tiere nach 20 min (15+10 mg/kg) bzw. nach 50 min (60+30 mg/kg) zu verzeichnen, die bis zur 100. Minute (15+10 mg/kg) bzw. über den gesamten Beobachtungszeitraum (60+30 mg/kg) anhielt. Bei zwei (30+15 mg/kg) bzw. fünf (60+30 mg/kg) *dt*^{sz}-Hamstern, trat von min 10 bis 60 intensives Schnüffeln mit angehobenen Kopf und verstärkter Tasthaarvibration auf sowie eine stark abgeflachte Körperhaltung, die sich über die gesamte Beobachtungsdauer erstreckte.



Abb. 19: Wirkung des M4-Rezeptor-Antagonisten **Tropicamid** in Kombination mit dem M1-Rezeptor-Antagonisten **Trihexyphenidyl** nach einmaliger systemischer Applikation von 15+10, 30+15 und 60+30 mg/kg (i.p.) auf den **Schweregrad dystoner Episoden** bei *dt^{sz}*-Hamstern. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 5 ml/kg. Der individuelle Schweregrad wurde nach Stressinduktion durch die "triple stimulation technique" innerhalb von 3 h erreicht. Angegeben sind die M.W. + S.E., die sich aus dem jeweils maximal erreichten Dystoniestadium der Hamster in der ersten, zweiten und dritten h nach Stressinduktion ergeben. Diese Aufteilung des Beobachtungszeitraums in drei Einzelstunden diente der Erfassung der Progression der Dystonie. Dadurch sind Rückschlüsse auf das Einsetzen der Wirkung sowie auf die Wirkungsdauer der Testsubstanzen möglich. Die Vor- bzw. Nachkontrollen (weiße Balken) erfolgten in Form von Vehikelapplikationen 2-3 Tage vor bzw. nach der Substanzapplikation (graue Balken) im Alter der maximalen Dystonieausprägung (i.d.R. 30.-42. LT) an denselben Tieren, so dass jedes Tier seine eigene Kontrolle darstellte. Die Sterne kennzeichnen signifikante Effekte (p*<0,05, p**<0,01) der Substanz auf den Schweregrad der Dystonie im Vergleich zur Vor- <u>und</u> Nachkontrolle. Die Größen der Tiergruppen sind der Tab. 8 zu entnehmen.

4.1.1.1.2. Einmalige systemische Applikation von Pirenzepin

Pirenzepin, ein peripher wirkender M1-Rezeptor-Antagonist, wurde zwei Gruppen von *dt*^{sz}-Hamstern in einer Dosierung von 25 mg/kg sowie 50 mg/kg i.p. verabreicht. Die Wirkungen von Pirenzepin auf die Schwere der Dystonie sind in Abb. 20 dargestellt.

Bei beiden systemisch verabreichten Dosierungen (25 und 50 mg/kg) konnte kein Einfluss der Substanz auf den Schweregrad der dystonen Episoden festgestellt werden.

Die Verabreichung von Pirenzepin in den genannten Dosierungen hatte zudem keinen signifikanten Einfluss auf die Latency on (s. Tab. 8).



Abb. 20: Wirkungen von **Pirenzepin** (25 und 50 mg/kg), einem M1-Rezeptor-Antagonisten, der nicht die Blut-Hirn-Schranke passiert, auf den **Schweregrad der Dystonie** bei *dt^{sz}*-Hamstern. Der graue Balken kennzeichnet die Behandlung mit Pirenzepin, der weiße Balken rechts bzw. links vom grauen Balken stellt die Vor- bzw. Nachkontrolle dar. Die Abbildung zeigt die M.W. + S.E. der maximal erreichten Dystonie-Schweregrade bezogen auf die erste, zweite und dritte Beobachtungsstunde nach Applikation der Substanz oder des Vehikels. Die Größen der Tiergruppen sind der Tab. 8 zu entnehmen. Weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 19.

Durch die Applikation von Pirenzepin (25 mg/kg) war bei zwei Tieren während der ersten und zweiten Beobachtungsstunde bzw. über den gesamten Beobachtungszeitraum eine geringbis mittelgradige Ataxie zu verzeichnen, während bei einer Dosierung von 50 mg/kg zwei Tiere eine geringgradige Ataxie im Laufe der ersten Beobachtungsstunde aufwiesen. Die Verabreichung der niedrigeren Dosis (25 mg/kg) löste bei drei Tieren außerdem eine geringbis mittelgradige Hyperaktivität aus, die angefangen ab min 5 nach Injektion der Substanz über einen Zeitraum von 2 h anhielt. Zwei *dt^{sz}*-Hamster zeigten hingegen ab der 40. min eine mittelgradige Hypolokomotion, die von der 75. min bis zum Ende der dritten Beobachtungsstunde nur noch geringgradige ausgeprägt war. Zwei weitere Tiere der niedrigen Dosierung wiesen während der gesamten dritten Beobachtungsstunde eine stark abgeflachte Körperhaltung auf.

Substanz	Dosierung	L	(n)		
	(mg/kg)	Vorkontrolle	Substanz	Nachkontrolle	
Tropicamid	15 + 10	5,5 ± 1,6	2,2 ± 0,7	2,2 ± 0,8	6 (4 ♀, 2 ♂)
+	30 + 15	5,0 ± 0,9	13,2 ± 2,6*	4,7 ± 1,8	6 (4 ♀, 2 ♂)
Trihexyphenidyl	60 + 30	2,8 ± 0,5	12,6 ± 2,0**	6,1 ± 1,7	8 (5 ♀, 3 ♂)
Pirenzepin	25	8,4 ± 2,6	5,9 ± 1,0	4,6 ± 1,5	8 (2 ♀, 6 ♂ੈ)
	50	7,5 ± 1,7	3,0 ± 0,3	6,0 ± 1,5	8 (3 ♀, 5 ♂ੈ)

Tab. 8: "Latency on", d.h. Latenzzeit von der Induktion der Dystonie bis zum Auftreten erster eindeutiger dystoner Bewegungsstörungen (Stadium 2) nach intraperitonealer Applikation der aufgeführten Testsubstanzen. Die Latenzzeiten sind als M.W. \pm S.E. der einzelnen Dosierungen, getrennt nach Vorkontrolle, Substanz und Nachkontrolle, angegeben. Außerdem sind die entsprechenden Tierzahlen (n) der einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. Die Sterne kennzeichnen eine signifikante Verzögerung der Latency on (*p<0,05, **p<0,01) durch die Substanzen im Vergleich zur Vor- und Nachkontrolle.

4.1.1.2. Systemisch chronischer Versuch über einen Zeitraum von 21 Tagen

Da Anticholinergika bei Dystoniepatienten erst nach wochenlanger Einnahme ihre volle Effektivität entfalten, sollte mit der täglichen systemischen Verabreichung von Trihexyphenidyl sowie der kombinierten Gabe von Tropicamid und Trihexyphenidyl über einen Zeitraum von 21 Tagen überprüft werden, ob eine Steigerung der nach einmaliger Gabe moderat ausgeprägten antidystonen Wirksamkeit durch eine langfristige Applikation erzielt werden kann. Erste Ergebnisse einer langfristigen Manipulation des M4-Rezeptors mit Tropicamid allein zeigten nur moderate antidystone Effekte im Sinne einer verzögerten Latenzzeit (Smiljanic, 2010).

Auch der M1-Rezeptor-Antagonist Pirenzepin, der nicht die Blut-Hirn-Schranke passiert, wurde in diese Untersuchungen einbezogen.

4.1.1.2.1. Tägliche systemische Applikation von Trihexyphenidyl

Bei dieser Untersuchung erhielt eine Tiergruppe (n=7) über einen Zeitraum von 21 Tagen eine i.p. Injektion von Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 20 mg/kg, eine zweite Tiergruppe (n=7) über 21 Tage das Vehikel (Cyclodextrin 20%).

Wie in Abb. 21 ersichtlich, erzielte die tägliche systemische Applikation von Trihexyphenidyl über einen Zeitraum von 21 Tagen keine signifikante Reduktion der maximalen Dystonieschwere im Vergleich zur Vehikelbehandlung. Auch die statistische Auswertung der Areas under the curve (AUC) in Bezug auf den Schweregrad der Dystonie sowie die Varianzanalyse zum Vergleich der beiden Tiergruppen an den einzelnen Testtagen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den substanz- und den vehikelbehandelten *dt*^{sz}-Hamstern.

Bezüglich der Latency on waren ebenfalls keinerlei signifikante Effekte über den gesamten Versuchszeitraum von 21 Tagen zu verzeichnen (nicht dargestellt). Auch der Vergleich der AUC sowie der Vergleich der beiden Testgruppen an den einzelnen Testtagen mittels Kruskal-Wallis/Mann-Whitney-U-Test wiesen keine signifikanten Veränderungen auf.

Auch in der sich nach der Behandlung mit Trihexyphenidyl anschließenden Verlaufskontrolle konnten keine Unterschiede zwischen der substanz- und der vehikelbehandelten Tiergruppe beobachtet werden (s. Abb. 21).



Abb. 21: Dargestellt ist der Effekt einer täglichen **Trihexyphenidyl**-Applikation über einen Zeitraum von 21 Tagen auf den maximal erreichten **Schweregrad der Dystonie** bei *dt*^{sz}-Hamstern. Eine Gruppe (n=7) wurde einmal täglich mit Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 20 mg/kg behandelt (schwarze Kreise). Eine zweite Gruppe (n=7) erhielt über den gesamten Zeitraum von 21 Tagen einmal täglich das Vehikel (20%iges Cyclodextrin) (weiße Kreise). Dargestellt sind die M.W. ± S.E. der alle zwei bis drei Tage während des Versuchszeitraumes maximal erreichten Dystonie-Schweregrade innerhalb von 3 h nach Stressinduktion mittels "triple stimulation technique". Im Anschluss an den 21tägigen Behandlungszeitraum erfolgte bis zum 59. LT der Tiere eine Verlaufskontrolle, in der alle zwei bis drei Tage mittels der "triple stimulation technique" und i.p. Applikation isotoner NaCI-Lösung eine dystone Episode ausgelöst wurde. Hierdurch sollte ermittelt werden, ob sich durch die vorangehende Behandlung der Verlauf der Spontanremission ändert oder durch Absetzen der Substanz ein "Rebound-Effekt" eintreten könnte.

Als Nebenwirkung der chronischen Gabe von Trihexyphenidyl wurde eine abgeflachte Körperhaltung während des Laufens festgestellt, die bei einem Tier bis Tag 20 der 21tägigen Behandlung, bei einem weiteren Tier sogar über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten war. Interessanterweise war auch bei drei Kontrolltieren eine abgeflachte Körperhaltung an einzelnen Testtagen zu verzeichnen. Am 34. LT zeigten fünf Tiere nach Applikation von Trihexyphenidyl während der ersten und teils zweiten Beobachtungsstunde eine geringgradige Hypolokomotion. Ein weiterer substanzbehandelter Hamster sowie zwei Kontrolltiere zeigten hingegen eine geringgradige Hyperaktivität in der ersten und zweiten h. Im Alter von 41. LT war bei sechs Tieren nach Gabe von Trihexyphenidyl eine gering- bis mittelgradige Hyperlokomotion zu verzeichnen. Mit Beginn der Verlaufskontrolle ab dem 43. LT der Hamster nahmen Schweregrad und Häufigkeit der beschriebenen unerwünschten Effekte ab. Eine Ausnahme von der Regression der Nebenwirkungen bildeten hierbei zwei Tiere, bei denen in einem Alter vom 45. bis zum 57. LT erstmals Anzeichen einer geringgradigen Ataxie sowie eine gering- bis mittelgradig ausgeprägte Hyperlokomotion meist während der zweiten und dritten Beobachtungsstunde zu sehen war.

4.1.1.2.2. Tägliche systemische Applikation von Tropicamid und Trihexyphenidyl

In diesem Versuch wurde eine Gruppe von *dt*^{sz}-Hamstern (n=9) mit einer Kombination aus Tropicamid und Trihexyphenidyl (30 mg/kg +15 mg/kg) täglich über 21 Tage behandelt, während eine zweite Tiergruppe (n=9) über den gesamten Zeitraum von 21 Tagen das Vehikel (Cyclodextrin 20%) erhielt.

Wie aus Abb. 22 ersichtlich, gab es bei der täglichen systemischen Applikation der Kombination aus Tropicamid und Trihexyphenidyl über einen Zeitraum von 21 Tagen keine signifikanten Effekte auf den maximal erreichten Schweregrad der Dystonie. Die statistischen Auswertungen anhand der ermittelten AUC sowie der Vergleich der beiden Tiergruppen im Kruskal-Wallis/Mann-Whitney-U-Test an den einzelnen Testtagen zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Auch die Latency on konnte durch die kombinierte chronische Gabe von Tropicamid und Trihexyphenidyl über 21 Tage nicht signifikant verändert werden (nicht dargestellt). Die statistische Auswertung der Latency on mittels der AUC sowie die Varianzanalyse zum Vergleich der beiden Tiergruppen an den einzelnen Testtagen ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

In der sich an den Behandlungszeitraum anschließenden Verlaufskontrolle mit 0,9% igem NaCl konnten ebenfalls keine weiteren Unterschiede zwischen der substanz- und der vehikelbehandelten Tiergruppe festgestellt werden (s. Abb. 22).



Abb. 22: Dargestellt ist der Effekt einer täglichen kombinierten Gabe des M4-Rezeptor-Antagonisten **Tropicamid** und des M1-Rezeptor-Antagonisten **Trihexyphenidyl** über einen Zeitraum von 21 Tagen auf den maximal erreichten **Schweregrad der Dystonie** bei *dt^{sz}*-Hamstern während der **dritten Beobachtungsstunde**. Eine Gruppe (n=9) wurde einmal täglich mit Tropicamid + Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 30 mg/kg + 15 mg/kg i.p. behandelt (schwarze Kreise). Eine zweite Gruppe (n=9) erhielt über den gesamten Zeitraum von 21 Tagen einmal täglich das Vehikel (20%iges Cyclodextrin) (weiße Kreise). Dargestellt sind die M.W. ± S.E. der alle zwei bis drei Tage während des Versuchszeitraumes maximal erreichten Dystonie-Schweregrade innerhalb von 3 h nach Stressinduktion mittels "triple stimulation technique". Weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 21.

Obwohl die kombinierte Verabreichung von Tropicamid und Trihexyphenidyl im Vergleich zur Vehikelbehandlung nicht in der Lage war, die während des dreistündigen Beobachtungszeitraumes maximal erreichten Schweregrade dystoner Episoden bei den dtsz-Hamstern zu reduzieren, konnte während der ersten Beobachtungsstunde eine Abnahme der Dystonie-Schweregrade verzeichnet werden. Wie in Abb. 23 dargestellt, wiesen substanzbehandelte Tiere an ihrem 27., 29., 32. und 41. LT niedrigere Dystonie-Scores auf als die vehikelbehandelten Tiere. Statistische Auswertungen in der Zeitspanne vom 22. bis zum 31. LT (Einteilung der Intervalle s. Kap. 3.3.1.1.) ergaben darüber hinaus bei substanzbehandelten dtsz-Hamstern niedrigere AUC als bei vehikelbehandelten dtsz-Hamstern und bestätigten somit einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen (p=0,021).



Abb. 23: Dargestellt ist der Effekt einer täglichen kombinierten Gabe des M4-Rezeptor-Antagonisten **Tropicamid** und des M1-Rezeptor-Antagonisten **Trihexyphenidyl** über einen Zeitraum von 21 Tagen auf den **Schweregrad der Dystonie** bei *dt*^{sz}-Hamstern **während der ersten Beobachtungsstunde**. Eine Gruppe (n=9) wurde einmal täglich mit Tropicamid + Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 30 mg/kg + 15 mg/kg i.p. behandelt (schwarze Kreise). Eine zweite Gruppe (n=9) erhielt über den gesamten Zeitraum von 21 Tagen einmal täglich das Vehikel (20%iges Cyclodextrin) (weiße Kreise). Dargestellt sind die M.W. ± S.E. der alle zwei bis drei Tage während des Versuchszeitraumes maximal erreichten Dystonie-Schweregrade innerhalb der ersten h nach Stressinduktion mittels "triple stimulation technique". Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (*p<0,05) zwischen den beiden Tiergruppen hinsichtlich der Schwere der Dystonieausprägung. Mittels der AUC wurden für vier Tage in der Zeitspanne vom 22. bis zum 31. LT ein signifikanter Unterschied zwischen den substanz- und den vehikelbehandelten Tieren festgestellt (*p=0,021), welcher ebenfalls durch einen Stern gekennzeichnet ist.

Die nach kombinierter Gabe von Tropicamid und Trihexyphenidyl auftretenden Nebenwirkungen äußerten sich bei fünf bis acht Tieren in einer abgeflachten Körperhaltung während des Laufens. Außerdem wurde bei zwei bis vier Tieren eine gering- bis mittelgradige Hyperlokomotion meist während der ersten Beobachtungsstunde verzeichnet. Des Weiteren zeigte ein substanzbehandeltes Tier an Tag 6 sowie weitere vier Hamster an Tag 15 der 21tägigen Behandlungsphase eine geringgradige Ataxie während der zweiten Beobachtungsstunde. Auch bei dieser Untersuchung nahmen Schweregrad und Häufigkeit der unerwünschten Wirkungen mit Beginn der Applikation von NaCI im Rahmen der Verlaufskontrolle ab dem 43. LT der *dt^{sz}*-Hamster kontinuierlich ab.

4.1.1.2.3. Tägliche systemische Applikation von Pirenzepin

Bei dieser Untersuchung wurde eine Gruppe von *dt^{sz}*-Hamstern (n=6) täglich über 21 Tage mit dem peripher wirksamen M1-Rezeptor-Antagonisten Pirenzepin in einer Dosierung von 25 mg/kg behandelt, während eine weitere Tiergruppe (n=6) über die Dauer von 21 Tagen das Vehikel (0,9%iges NaCl) erhielt.

Wie in Abb. 24 ersichtlich, ergab die tägliche systemische Applikation von Pirenzepin keine signifikante Verbesserung der Dystonieschwere im *dt*^{sz}-Hamster. Bei der statistischen Auswertung der AUC sowie dem Vergleich der Tiergruppen an den einzelnen Testtagen mittels Kruskal-Wallis/Mann-Whitney-U-Test in Bezug auf den Schweregrad der Dystonie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den substanz- und den vehikelbehandelten Hamstern ermittelt werden.

Bezüglich der Latenzzeit bis zum Auftreten erster eindeutiger dystoner Symptome konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Pirenzepin und den mit Vehikel behandelten *dt*^{sz}-Hamstern festgestellt werden (nicht dargestellt). Auch die statistische Auswertung der ermittelten AUC sowie die Varianzanalyse zum Vergleich der Tiere an den einzelnen Testtagen ergaben keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Auch während der Verlaufskontrolle im Anschluss an die 21tägige Behandlung mit Pirenzepin waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der substanz- und der vehikelbehandelten Gruppe zu verzeichnen (s. Abb. 24).

Während der 21tägigen Behandlung mit 25 mg/kg Pirenzepin entwickelten ein bis drei Tiere eine abgeflachte Körperhaltung während des Laufens in der ersten und zweiten Beobachtungsstunde des jeweiligen Testtages. Ab dem vierten Testtag wiesen außerdem zwei bis fünf Tiere eine geringgradige Ataxie auf, die sich über die gesamte Versuchsdauer bis zum 59. LT der Tiere erstreckte. Des Weiteren zeigten jeweils vier bis fünf Tiere eine gering- bis mittelgradig ausgeprägte Hyperlokomotion, die ebenfalls über den gesamten Versuchszeitraum während der ersten, teils aber auch erst ab der zweiten sowie dritten Beobachtungsstunde zu beobachten war.



Abb. 24: Dargestellt ist der Effekt einer täglichen **Pirenzepin**-Applikation über einen Zeitraum von 21 Tagen auf den maximal erreichten **Schweregrad der Dystonie** bei dt^{sz} -Hamstern. Eine Gruppe (n=6) wurde einmal täglich mit Pirenzepin in einer Dosierung von 25 mg/kg i.p. behandelt (schwarze Kreise). Eine zweite Gruppe (n=6) erhielt über den gesamten Zeitraum von 21 Tagen einmal täglich das Vehikel (0,9% iges NaCl) (weiße Kreise). Dargestellt sind die M.W. ± S.E. der alle zwei bis drei Tage während des Versuchszeitraumes maximal erreichten Dystonie-Schweregrade innerhalb von 3 h nach Stressinduktion mittels "triple stimulation technique". Weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 21.

Es bleibt zusammenfassend zu vermerken, dass nach der 21tägigen Behandlungsphase sowohl bei allen substanzbehandelten Gruppen als auch den vehikelbehandelten Kontrollgruppen kein Abklingen der Dystonie-Ausprägung zu verzeichnen war, so dass der durch frühere Studien beobachtete altersabhängige Dystonieverlauf (Richter und Löscher, 1998), bei dem die Symptome der Dystonie ab etwa dem 42. LT nachließen und ab ca. dem 70. LT nicht mehr durch Stress induzierbar waren, bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten chronischen Versuchen nicht bestätigt werden konnte.

Es muss außerdem für die Interpretation der Ergebnisse beachtet werden, dass während der gesamten Versuchsdauer von 59 Tagen bei der chronischen Applikation von Trihexyphenidyl beide Tiergruppen nur moderat ausgeprägte Dystonie-Schweregrade entwickelten.

4.1.1.3. Striatale Mikroinjektionen

Die striatalen Mikroinjektionen sollten Aufschluss darüber geben, ob mögliche Effekte anticholinerger Substanzen bei der akuten systemischen Gabe auf deren Wirkung im Striatum beruhen. Die lokale striatale Manipulation von M4-Rezeptoren mittels Mikroinjektion von Tropicamid im Rahmen vorangegangener Untersuchungen führte nicht zur Reduktion der Dystonieschwere, zeigte aber eine Tendenz zur Verlängerung der Latenzzeit (Smiljanic, 2010). Um der pathophysiologischen Rolle striataler mAChR am Dystoniegeschehen weiter nachzugehen, wurden daher intrastriatale Mikroinjektionen des M1-Rezeptor-Antagonisten Trihexyphenidyl allein sowie in Kombination mit dem M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid durchgeführt.

4.1.1.3.1. Striatale Mikroinjektionen von Trihexyphenidyl

Für diese Untersuchung wurden drei Gruppen von dt^{sz} -Hamstern mit Trihexyphenidyl in Dosierungen von jeweils 200 ng (n=7), 400 ng (n=7) oder 800 ng/0,5 µl 10% iges Cyclodextrin/Hemisphäre (n=7) behandelt. Die Wirkungen der striatalen Mikroinjektionen von Trihexyphenidyl auf die Schwere der Dystonie sind in Abb. 25 dargestellt.

Die bilaterale striatale Applikation von Trihexyphenidyl hatte in keiner der untersuchten Dosierungen einen signifikanten Effekt auf den Schweregrad der Dystonie (s. Abb. 25).

Die Latenzzeit bis zum Auftreten erster dystoner Symptome (Latency on) war nach der striatalen Mikroinjektion von Trihexyphenidyl (200 ng, 400 ng und 800 ng/0,5 µl/ Hemisphäre) ebenfalls unverändert (s. Tab. 9).

Nach bilateraler striataler Gabe von Trihexyphenidyl zeigte sich bei der mittleren Dosierung (400 ng/0,5 µl/Hem.) eine abgeflachte Körperhaltung der Tiere während des Laufens in der ersten und zweiten Beobachtungsstunde. Bei einem Tier war nach Applikation der niedrigsten Dosierung (200 ng/0,5 µl/Hem.) ein gesteigertes Putzverhalten zu beobachten. Nach Applikation der mittleren und höchsten Dosierung (800 ng/0,5 µl/Hem.) zeigten vier Hamster eine gering- bis mittelgradige Hyperaktivität dosisabhängig von der ersten bis zur dritten Beobachtungsstunde. In der Gruppe, die zuvor mit 800 ng Trihexyphenidyl behandelt worden war, war auch in der Nachkontrolle eine Hyperaktivität zu verzeichnen. Zwei Tiere (400 ng/0,5 µl/Hem.) wiesen hingegen von der 0. bis zur 60. min bzw. von der 0. bis zur 130. min eine geringgradige Hypolokomotion auf. Des Weiteren konnte bei einzelnen Tieren der mittleren Dosierung ein sog. "diving", eine Art tauchende Bewegung des Kopfes, während der zweiten und dritten Stunde beobachtet werden.



Abb. 25: Wirkung des M1-Rezeptor-Antagonisten **Trihexyphenidyl** nach bilateraler intrastriataler Applikation von 200, 400 und 800 ng pro Hemisphäre auf den **Schweregrad dystoner Episoden** bei *dt^{sz}*-Hamstern. Das Injektionsvolumen betrug 0,5 µl/Hemisphäre. Der individuelle Schweregrad wurde nach Stressinduktion durch die "triple stimulation technique" innerhalb von 3 h erreicht. Angegeben sind die M.W. + S.E., die sich aus dem jeweils maximal erreichten Dystoniestadium der Hamster in der ersten, zweiten und dritten h nach Stressinduktion ergeben. Diese Aufteilung des Beobachtungszeitraums in 3 Einzelstunden diente der Erfassung der Progression der Dystonie. Dadurch sind Rückschlüsse auf das Einsetzen der Wirkung sowie auf die Wirkungsdauer der Testsubstanzen möglich. Die Vor- bzw. Nachkontrollen (weiße Balken) erfolgten in Form von Vehikelapplikationen 2-3 Tage vor bzw. nach der Substanzapplikation (graue Balken) im Alter der maximalen Dystonieausprägung (i.d.R. 30.-42. LT) an denselben Tieren, so dass jedes Tier seine eigene Kontrolle darstellte. Die Größen der Tiergruppen sind der Tab. 9 zu entnehmen.

4.1.1.3.2. Striatale Mikroinjektionen von Tropicamid und Trihexyphenidyl

In diesem Versuch wurden drei Gruppen von dt^{sz} -Hamstern mit einer Kombination aus Tropicamid und Trihexyphenidyl in folgenden Konzentrationen behandelt: jeweils 200 + 200 (n=6), 400 + 400 (n=9) und 800 + 800 (n=8) ng/0,5 µl 10%iges Cyclodextrin/Hemisphäre. Die Wirkungen der unterschiedlichen Konzentrationen der Kombination aus Tropicamid und Trihexyphenidyl sind in Abb. 26 dargestellt.

Durch die intrastriatale Gabe der Kombination von Tropicamid und Trihexyphenidyl konnten mit keiner der getesteten Dosierungen signifikante Effekte auf die Dystonieschwere erzielt werden (s. Abb. 26).

Auch bei der Latency on waren keine signifikanten Veränderungen zu verzeichnen (s. Tab. 9).



Abb. 26: Wirkung des M4-Rezeptor-Antagonisten **Tropicamid** in Kombination mit dem M1-Rezeptor-Antagonisten **Trihexyphenidyl** nach bilateraler intrastriataler Applikation von 200 + 200, 400 + 400 und 800 + 800 ng pro Hemisphäre auf den **Schweregrad dystoner Episoden** bei *dt^{sz}*-Hamstern. Der graue Balken kennzeichnet die Behandlung mit Tropicamid + Trihexyphenidyl, der weiße Balken rechts bzw. links vom grauen Balken stellt die Vor- bzw. Nachkontrolle dar. Die Abbildung zeigt die M.W. + S.E. der maximal erreichten Dystonie-Schweregrade bezogen auf die erste, zweite und dritte Beobachtungsstunde nach Applikation der Substanz oder des Vehikels (10 %iges Cyclodextrin). Die Größen der Tiergruppen sind der Tab. 9 zu entnehmen. Weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 25.

Infolge der bilateralen Mikroinjektion einer Kombination aus Tropicamid und Trihexyphenidyl wurde eine gering- bis mittelgradige Hyperaktivität festgestellt, die nach Applikation der niedrigen bzw. mittleren Dosierung bei jeweils zwei Tieren während der ersten und zweiten Beobachtungsstunde und nach Gabe der höchsten Dosierung bei einem Tier über die gesamten 3 h zu beobachten war. Ein weiteres Tier (800 + 800 ng/0,5 µl/Hem.) wies in der zweiten und dritten Beobachtungsstunde eine abgeflachte Körperhaltung auf, während ein anderes Tier in dieser Zeit "diving" (tauchende Bewegung des Kopfes) zeigte.

4.1.1.3.3. Striatale Mikroinjektionen von VU0152100

Vorangehende Untersuchungen an *dt*^{sz}-Hamstern ergaben, dass durch die einmalige systemische Applikation des relativ selektiven M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid die Latenz bis zum Auftreten erster eindeutiger dystoner Symptome verzögert war (Smiljanic, 2010). Mit der lokalen intrastriatalen Mikroinjektion dieser Substanz konnten jedoch keine antidystonen Effekte erzielt werden. Als Grund hierfür wurde die Beteiligung extrastriataler Hirnregionen oder die nur moderate Selektivität des Tropicamids bezüglich des mAChR4 angenommen (Smiljanic, 2010). Da zurzeit allerdings keine hochselektiven M4-Rezeptor-

Antagonisten auf dem Markt verfügbar sind, sollte stattdessen mit Hilfe des hochselektiven positiven allosterischen Modulators VU0152100 näher untersucht werden, inwiefern striatale M4-Rezeptoren tatsächlich in das Dystoniegeschehen bei *dt*^{sz}-Hamstern involviert sind.

Bei diesem Versuch wurden Tiere mit niedrigen Dystonie-Scores gewählt, da bei dem allosterischen Modulator VU0152100 eine prodystone Wirkung anzunehmen war und hohe Schweregrade mögliche Effekte überdeckt hätten. Die Wirkung des VU0152100 auf den Schweregrad der Dystonie wurde in Dosierungen von 0,125 (n=6) und 12,5 (n=5) ng/0,5 µl 5% iges DMSO/Hemisphäre in zwei Gruppen von *dt*^{sz}-Hamstern untersucht. Auf die Verabreichung höherer Konzentrationen wurde in diesem Versuch verzichtet, da die Löslichkeit der Substanz im Vehikel mit steigender Konzentration begrenzt war. Auch mangelnde Effekte auf die Dystonieschwere trotz deutlicher Verhaltenseffekte sprachen gegen den Einsatz höherer Dosierungen. Die Wirkungen der bilateralen striatalen Gabe von VU0152100 auf die Dystonie-Schweregrade sind in Abb. 27 dargestellt.

Nach intrastriataler Applikation von VU0152100 konnten keine signifikanten Effekte auf die Schwere der dystonen Episoden beobachtet werden (s. Abb. 27).

Auch bei der Latenz bis zum Auftreten erster eindeutiger dystoner Symptome (Latency on) konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (s Tab. 9).

Als Folge der Behandlung mit VU0152100 zeigte sich bei zwei Tieren (0,125 und 12,5 ng/0,5 µl/Hem.) über den gesamten Beobachtungszeitraum von 3 h eine abgeflachte Körperhaltung während des Laufens. Nach Applikation von 0,125 ng wurde bei einem Tier eine geringgradige Kopfschiefhaltung zur linken Seite festgestellt, die aber in der anschließenden Nachkontrolle sowie nach Applikation der höheren Konzentration nicht mehr vorhanden war. Bei einem Tier war während der 1. Beobachtungsstunde nach Applikation der höheren Konzentration eine gering- bis mittelgradige Hyperaktivität zu beobachten, wohingegen ein anderes Tier eine geringgradige Hypolokomotion über den gesamten Beobachtungszeitraum von 3 h aufwies.



Abb. 27: Wirkung des positiven allosterischen Modulators **VU0152100** nach bilateraler intrastriataler Applikation von 0,125 ng bzw. 12,5 ng pro Hemisphäre auf den **Schweregrad dystoner Episoden** bei *dt^{sz}*-Hamstern. Der graue Balken kennzeichnet die Behandlung mit VU0152100, der weiße Balken rechts bzw. links vom grauen Balken stellt die Vor- bzw. Nachkontrolle dar. Die Abbildung zeigt die M.W. + S.E. der maximal erreichten Dystonie-Schweregrade bezogen auf die erste, zweite und dritte Beobachtungsstunde nach Applikation der Substanz oder des Vehikels (5% iges DMSO). Die Größen der Tiergruppen sind der Tab. 9 zu entnehmen. Weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 25.

Bei der an die pharmakologischen Untersuchungen anschließenden Überprüfung der Lokalisation der implantierten Führungskanülen waren außerdem bei der Mehrheit der mit VU0152100 behandelten Tiere großflächige Veränderungen im Bereich des dorsalen Striatums mit zahlreichen Entzündungszellen und partieller Einschmelzung des umgebenden Gewebes festgestellt worden (s. Abb. 28).



Abb. 28: Histologische Abbildung eines mit Thionin gefärbten Gehirnschnittes eines dt^{sz} Hamsters nach intrastriataler Applikation des positiven allosterischen Modulators VU0152100 (25-fache Vergrößerung). Deutlich erkennbar sind die massiven entzündlichen Veränderungen im Bereich des dorsalen Striatums (violette Färbung). Die Länge des Referenzbalkens beträgt 500 μm im histologischen Schnitt.

Substanz	Dosierung	L	(n)		
	(ng/Hem.)	Vorkontrolle	Substanz	Nachkontrolle	
Trihexyphenidyl	200	10,9 ± 2,0	10,0 ± 1,9	11,4 ± 3,0	7 (4 ♀, 3 ♂)
	400	10,7 ± 1,0	13,7 ± 2,3	14,4 ± 2,2	7 (3 ♀, 4 ♂)
	800	10,3 ± 1,5	9,0 ± 1,7	12,6 ± 0,8	7 (5 ♀, 2 ♂)
Tropicamid	200 + 200	12,8 ± 2,0	11,2 ± 1,6	10,8 ± 2,0	6 (3 ♀, 3 ♂)
+	400 + 400	11,9 ± 2,3	13,9 ± 3,0	9,1 ± 1,8	9 (6 ♀, 3 ♂)
Trihexyphenidyl	800 + 800	13,1 ± 1,1	9,1 ± 0,9	11,8 ± 2,2	8 (4 ♀, 4 ♂)
VU0152100	0,125	6,2 ± 0,5	6,3 ± 0,3	6,7 ± 1,7	6 (5 ♀, 1 ♂)
	12,5	10,6 ± 2,9	6,2 ± 1,2	5,2 ± 1,2	5 (5 ♀, 0 ♂)

Tab. 9: "Latency on", d.h. Latenzzeit von der Induktion der Dystonie bis zum Auftreten erster eindeutiger dystoner Bewegungsstörungen (Stadium 2) nach bilateral striataler Applikation der aufgeführten Testsubstanzen. Die Latenzzeiten sind als M.W. ± S.E. der einzelnen Dosierungen, getrennt nach Vorkontrolle, Substanz und Nachkontrolle angegeben. Außerdem sind die entsprechenden Tierzahlen (n) der einzelnen Versuchsgruppen dargestellt.

4.1.2. Rezeptorautoradiographische Untersuchungen

Zur Erfassung möglicher Unterschiede im cholinergen System von *dt*^{sz}-Hamstern im Vergleich zu nicht-dystonen Kontrollhamstern wurden im Rahmen rezeptorautoradiographischer Analysen die Bindungsaffinitäten sowie die Dichte der mAChR M1 sowie M2/M4 untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte hierbei anhand der für beide Versuchsgruppen jeweils ermittelten M.W. und S.E.. Die in den Tab. 10 und 11 für die einzelnen Gehirnregionen aufgeführten p-Werte wurden mit Hilfe einer one-way ANOVA und anschließendem Student's t-Test errechnet.

Nach Anwendung der Bonferroni-Holm-Prozedur zur Korrektur einer möglichen α -Fehler-Kumulierung ergab sich bezüglich der [H³]-Pirenzepin-Bindung an den mAChR M1 für die 33 untersuchten Gehirnregionen ein Signifikanzniveau $\alpha = 0,0015$. Beim Vergleich der im t-Test ermittelten p-Werte mit dem korrigierten Niveau α konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dt^{sz} -Hamstern und Kontrolltieren für die einzelnen Gehirnregionen ermittelt werden. Eine detaillierte Übersicht zur Bindung des [H³]-Pirenzepin an den mAChR vom Subtyp M1 in den 33 untersuchten Gehirnregionen ist der Tab. 10 zu entnehmen.

Hinsichtlich der [H³]-AFDX-Bindung an den mAChR M2/M4 wurde mit Hilfe des Bonferroni-Holm-Verfahrens ein Signifikanzniveau von α = 0,0017 errechnet. Ausgehend von diesem korrigierten α -Wert wurden verglichen mit den zuvor ermittelten p-Werten signifikante Unterschiede in der Region der lateralen Amygdala sowie dem piriformen Kortex zwischen *dt*^{sz}-Hamstern und Kontrolltieren festgestellt. Eine detaillierte Übersicht zur Bindung des [H³]-AFDX an den mAChR vom Subtyp M2/M4 in den 32 untersuchten Gehirnregionen ist in Tab. 11 dargestellt.

[H³]-Pirenzepin-Bindung an mAChR vom Subtyp M1 (μCi/g Gewebe)						
Gehirnregion	<i>dt^{sz}-</i> Hamster	Kontrolltiere	р			
	(n = 10)	(n = 10)				
Anteriorer olfaktorischer Nucleus	6,191 ± 0,135	5,557 ± 0,255	0,041			
Olfaktorisches Tuberkel	6,556 ± 6.917	6,917 ± 0,332	0,485			
Olfaktorischer Bulbus	$3,483 \pm 0,077$	3,281 ± 0,118	0,278			
Kortex						
frontaler Kortex	$3,630 \pm 0,096$	3,719 ± 0,125	0,576			
infralimbischer Kortex	4,418 ± 0,356	4,926 ± 0,202	0,231			
anteriorer cingulärer Kortex	4,295 ± 0,160	4,765 ± 0,160	0,052			
agranulärer Kortex	4,357 ± 0,317	4,239 ± 0,162	0,961			
piriformer Kortex	7,375 ± 0,267	7,109 ± 0,273	0,495			
somatosensorischer Kortex	3,605 ± 0,180	3,760 ± 0,139	0,503			
Nucleus accumbens						
Kern	6,695 ± 0,221	6,871 ± 0,195	0.557			
Schale	4,803 ± 0.192	5,627 ± 0,286	0,028			
Caudatus Putamen						
anterior	6,547 ± 0,230	6,430 ± 0,238	0,727			
dorsomedial	5,678 ± 0,229	6,446 ± 0,172	0,015			
dorsolateral	5,781 ± 0,212	6,154 ± 0,147	0,165			
ventromedial	5,487 ± 0,306	5,902 ± 0,164	0,248			
ventrolateral	6,681 ± 0,261	6,945 ± 0,195	0,428			
posterior	5,646 ± 0,186	5,980 ± 0,182	0,217			
Globus pallidus externus	1,153 ± 0,073	1,270 ± 0,078	0,287			
Claustrum	5,188 ± 0,164	4,570 ± 0,198	0,027			
Laterales Septum	1,528 ± 0,145	1,702 ± 0,076	0,302			
Substantia nigra						
pars reticulata	1,353 ± 0,061	1,307 ± 0,065	0.611			
pars compacta	1,297 ± 0,073	1,139 ± 0,067	0,172			
Thalamus						
ventromedialer Nucleus	0,959 ± 0,051	1,088 ± 0,111	0,308			
ventrolateraler Nucleus	1,120 ± 0.053	1,254 ± 0,114	0,299			
Hippocampus	8,267 ± 0,168	8,749 ± 0,222	0,101			
Hypothalamus	0,942 ± 0,073	1,184 ± 0,098	0,064			
Interpeduncularer Nucleus	0,807 ± 0,090 0,807 ± 0,088		0.996			
Amygdala						
basolateral	3,439 ± 0,276	3,436 ± 0,262	0.995			
lateral	3,863 ± 0,426	3,513 ± 0,276	0,499			
Bettkern der Stria terminalis	1,630 ± 0,111	2,000 ± 0,088	0,018			
Pontiner Nucleus	1,144 ± 0,039	1,165 ± 0,080	0,816			
Raphe dorsalis	1,198 ± 0,098	1,388 ± 0,134	0,269			
Raphe medialis	0,876 ± 0,114	0,780 ± 0,093	0,524			

Tab. 10: Detaillierte Übersicht zur $[H^3]$ -Pirenzepin-Bindung an mAChR vom Subtyp M1 in den 33 untersuchten Gehirnregionen. Die einzelnen Daten sind als M.W. \pm S.E. von zehn dt^{sz} -Hamstern und zehn Kontrolltieren angegeben.

[H³]-AFDX-Bindung an mAChR vom Subtyp M2/M4 (μCi/g Gewebe)						
Gehirnregion	<i>dt^{sz}-</i> Hamster	Kontrolltiere	р			
	(n = 10)	(n = 10)				
Anteriorer olfaktorischer Nucleus	1,188 ± 0,082	0,983 ± 0,063	0,062			
Olfaktorisches Tuberkel	3,162 ± 0,197	3,853 ± 0,176	0,018			
Olfaktorischer Bulbus	1,982 ± 0,081	2,312 ± 0,149	0,043			
Kortex						
frontaler Kortex	2,427 ± 0,137	2,563 ± 0,108	0,466			
infralimbischer Kortex	2,298 ± 0,125	2,470 ± 0,096	0,289			
anteriorer cingulärer Kortex	2,368 ± 0,118	2,575 ± 0,102	0,200			
piriformer Kortex	4,598 ± 0,140	5,711 ± 0,237	<0,001			
somatosensorischer Kortex	2,625 ± 0,123	± 0,123 2,683 ± 0,047				
Nucleus accumbens						
Kern	1,833 ± 0,150	1,268 ± 0,127	0,010			
Schale	1,756 ± 0,217	1,744 ± 0,253	0,971			
Caudatus Putamen						
anterior	3,298 ± 0,216	3,125 ± 0,159	0,528			
dorsomedial	3,040 ± 0,229	3,422 ± 0,209	0,235			
dorsolateral	3,726 ± 0,236	3,852 ± 0,183	0,676			
ventromedial	2,861 ± 0,228	2,912 ± 0,170	0,858			
ventrolateral	4,251 ± 0,224	4,162 ± 0,236	0,788			
posterior	3,392 ± 0,246	3,417 ± 0,173	0,934			
Globus pallidus externus	0,953 ± 0,157	1,028 ± 0,094	0,690			
Claustrum	1,317 ± 0,150	1,224 ± 0,104	0,617			
Laterales Septum	1,642 ± 0,156	1,758 ± 0,182	0,634			
Substantia nigra						
pars reticulata	1,227 ± 0,050	1,177 ± 0,029	0,403			
pars compacta	1,444 ± 0,072	1,391 ± 0,060	0,573			
Thalamus						
ventromedialer Nucleus	1,335 ± 0,064	1,286 ± 0,060	0,583			
ventrolateraler Nucleus	1,699 ± 0,069	1,738 ± 0,081	0,721			
Hippocampus	2,744 ± 0,076	2,686 ± 0,086	0,623			
Hypothalamus	1,469 ± 0,100	1,545 ± 0,090	0,583			
Interpeduncularer Nucleus	1,410 ± 0,076	1,286 ± 0,079	0,280			
Amygdala						
basolateral	1,218 ± 0,144	1,249 ± 0,115	0,848			
lateral	1,408 ± 0,082	2,158 ± 0,115	<0,001			
Bettkern der Stria terminalis	1,429 ± 0,061	1,417 ± 0,062	0,888			
Pontiner Nucleus	4,104 ± 0,265	3,661 ± 0,371	0,344			
Raphe dorsalis	1,506 ± 0,047	1,674 ± 0,158	0,122			
Raphe medialis	1,685 ± 0,116	1,553 ± 0,088	0,376			

Tab. 11: Detaillierte Übersicht zur [H³]-AFDX-Bindung an mAChR vom Subtyp M2/M4 in den 32 untersuchten Gehirnregionen. Die einzelnen Daten sind als M.W. \pm S.E. von zehn dt^{sz} -Hamstern und zehn Kontrolltieren angegeben. Signifikante p-Werte (α < oder =0,0017) sind fettgedruckt.

4.2. DYT1-Maus

4.2.1. Genotypisierung

Um sicherzustellen, dass die transgenen Mäuse das humane Defektgen in sich tragen, wurde eine Genotypisierung mittels PCR (Methode s. 3.2.2.1) durchgeführt. Wie in Abb. 29 beispielhaft dargestellt, wies das PCR-Produkt von Proben transgener Tiere eine deutliche Bande im Größenbereich von ~740 bp auf. Bei Kontrolltieren war hingegen keine Bande sichtbar. Somit konnte gewährleistet werden, dass nur die Mäuse in den Versuchen eingesetzt wurden, welche die oben beschriebene, für transgene Tiere typische Bande aufzeigten bzw. Tiere, die als Wildtyp-Tiere eingesetzt wurden, kein Defektgen aufwiesen.



Abb. 29: Beispiel einer Genotypisierung mittels PCR: A ist die DNA-Leiter (100 bp Leiter) als Standard zum Abgleich der Bandengröße der aufgetragenen Proben. E stellt die Positivkontrolle (Probe einer zuvor als transgen bekannten Maus) dar, F ist die Negativkontrolle (H₂O). B und C sind PCR-Produkte von transgen-positiven Tieren (DYT1), D zeigt das PCR-Produkt eines transgennegativen Tieres (Wildtyp).

4.2.2. Pharmakologische Manipulation des cholinergen Systems

Dem cholinergen Neurotransmittersystem wird eine entscheidende Rolle bei Dystonien zugesprochen (Pisani *et al.*, 2006). Um die funktionelle Relevanz des cholinergen Systems für das Auftreten von Bewegungsstörungen bei DYT1-Mäusen zu untersuchen, wurden im Rahmen verhaltenspharmakologischer Untersuchungen die Effekte von Pilocarpin, einem nicht Subtyp-spezifischen Agonisten an mAChR untersucht. Besonderes Augenmerk lag hierbei darauf, ob eine hieraus resultierende cholinerge Überaktivität dystone Symptome bei DYT1-Mäusen, die zwar das Defektgen tragen aber keine Dystonie-Symptomatik aufweisen, provozieren kann. Die hierfür ausgewählten Dosierungen sind in der Literatur als subkonvulsiv beschrieben (Konvulsionen ab 150-350 mg/kg bei systemischer Gabe).

Es wurden insgesamt 29 transgene DYT1-Mäuse sowie 30 Wildtyp-Tiere in einem Alter von ca. zwei Monaten in den Versuchen eingesetzt. Über den gesamten Versuchszeitraum wurde das KGW zur Beurteilung der Vitalität der Tiere ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass die Gewichtszunahmen bei beiden Versuchsgruppen gleich verliefen.

Von den 20 für die intrastriatale Mikroinjektion verwendeten Mäusen wurde kein Tier wegen Fehllokalisation der Führungskanülen oder Entzündungssymptomen von den statistischen Auswertungen ausgeschlossen. Sechs (50 µg/Hem.) bzw. zehn (25 µg/Hem.) Mäuse entwickelten im Laufe des Versuches jedoch epileptische Anfälle, sodass sie infolge der damit einhergehenden motorischen Einbußen lediglich im Activity Cage beobachtet werden konnten und daher auf eine statistische Auswertung der anderen Tests (s. Punkt 3.2.2.2.) bei diesen Tieren verzichtet wurde. Tiere, die für die akut systemische (n=19) bzw. die chronisch systemische (n=20) Verabreichung von Pilocarpin verwendet wurden, konnten alle in die statistischen Auswertungen einbezogen werden.

In den folgenden Kapiteln sind die Effekte des nicht Subtyp-spezifischen mAChR-Agonisten Pilocarpin nach systemischer bzw. lokaler striataler Applikation auf das Verhalten und die Motorik von transgenen DYT1-Mäusen und Wildtyp-Tieren dargestellt. Der Median mit 25./75. Perzentilen, das arithmetische Mittel (M.W.), S.E. sowie die Minimal- und Maximalwerte der einzelnen Tiere sind dem tabellarischen Anhang zu entnehmen.

4.2.2.1. Einmalige systemische Applikation von Pilocarpin

Für diese Untersuchung wurden DYT1- (n=7-9) bzw. Wildtyp-Mäuse (n=9-10) mit Pilocarpin in drei Dosierungen (75, 100 und 125 mg/kg) jeweils in Kombination mit N-Methyl-Scopolamin (1 mg/kg) behandelt.

Bei der Untersuchung der *neurologischen Reflexe* zur Ermittlung der Vitalität der Tiere war nach i.p. Applikation einer Dosis von 75 mg/kg Pilocarpin der *Lidreflex*, der *Orientierungsreflex*, der *Stellungsreflex* sowie der *Haltungsreflex* bei allen Tieren ungestört, d.h. die Reflexantwort erfolgte innerhalb von 1-2 sec. Lediglich bei einem transgenen Tier zeigte sich ein verzögertes Zurückziehen der Ohrmuschel beim Überprüfen des *ear twitch*. Nach Verabreichung der mittleren Dosierung von 100 mg/kg Pilocarpin zeigten zwei transgene Tiere einen verzögerten Stellungsreflex, während nach Applikation von 125 mg/kg Pilocarpin der Haltungsreflex eines Wildtyp-Tieres verzögert war. Bei der Untersuchung der neurologischen Reflexe vehikelbehandelter DYT1- und Wildtyp-Mäuse konnten keine Auffälligkeiten in der Reflexantwort festgestellt werden. Im Hinblick auf die *lokomotorische Aktivität* bewirkte die Gabe von Pilocarpin im Vergleich zur Vehikelkontrolle eine Reduktion der *horizontalen Aktivität (Transitions)*, sowohl innerhalb der Wildtyp-Gruppe (100 und 125 mg/kg), als auch bei transgenen DYT1-Mäusen (125 mg/kg) (s. Abb. 30 A). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen konnten infolge der Pilocarpin-Behandlung nicht festgestellt werden. Eine signifikant verminderte horizontale lokomotorische Aktivität bei DYT1-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren trat jedoch unerwarteterweise bei der Vehikelkontrolle zu 100 mg auf.

Auch die *vertikale Aktivität (Rearings)* war nach Applikation von Pilocarpin sowohl in der Gruppe der transgenen DYT1- (75 und 100 mg/kg) als auch derjenigen der Wildtyp-Mäuse (75, 100 und 125 mg/kg) signifikant vermindert (s. Abb. 30 B). Zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen gab es hingegen keine signifikanten Unterschiede sowohl während der Vehikel- als auch während der Substanzbehandlung.

Mittels *Rotarod* im Accelerating-Modus ergaben sich nach Applikation von 75 und 100 mg/kg Pilocarpin keine signifikanten Effekte auf die Koordination transgener DYT1- und Wildtyp-Mäuse im Vergleich zu vehikelbehandelten Tieren. Nach Applikation von 125 mg/kg jedoch waren bei beiden Tiergruppen deutliche Defizite in der Rotarod-Performance zu erkennen (s. Tab. 12). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen waren sowohl unter Vehikel als auch nach Gabe von Pilocarpin in allen drei Dosierungen nicht nachweisbar.

Im *Grip-strength Test*, der Rückschlüsse auf die Griffstärke der Tiere erlaubt, zeigten sich weder zwischen Substanz- und Vehikelapplikation innerhalb der Tiergruppen, noch zwischen den beiden Tiergruppen signifikante Unterschiede (Tab. 12).

Im *Wire-hang Test* ließen sich sowohl bei der Drehung um 90° (ohne Abb.) als auch bei der Drehung um 180° (s. Tab. 12) keine Unterschiede zwischen Substanz- und Vehikelbehandlung innerhalb der Tiergruppen erkennen. Auch zwischen den beiden Tiergruppen gab es keine Unterschiede.

Im *Footprint Test* bewirkte eine einmalige systemische Applikation von Pilocarpin (75, 100 und 125 mg/kg) im Vergleich zur Vehikelgabe eine Reduktion der *Schrittlänge* in beiden Tiergruppen, Unterschiede zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen lagen hierin jedoch nicht vor. Für die Vorderpfoten ergab sich dabei eine signifikant kürzere Schrittlänge der linken Körperseite sowohl bei DYT1-Mäusen, als auch bei Wildtyp-Tieren. Eine signifikant kürzere Schrittlänge der Vorderpfoten der rechten Körperseite wurde zudem bei der Wildtyp-Gruppe (75, 100 und 125 mg/kg) sowie bei DYT1-Mäusen nach Applikation von 100 mg/kg Pilocarpin festgestellt. Bezüglich der Schrittlänge der Hinterpfoten war innerhalb beider Tiergruppen eine signifikant verkürzte Schrittlänge der linken Körperseite im Vergleich zur Vehikelkontrolle nachweisbar. Bei Wildtyp-Mäusen zeigte sich außerdem nach Gabe von

100 bzw. 125 mg/kg, bei DYT1-Mäusen nach Applikation von 100 mg/kg Pilocarpin eine signifikant kürzere Schrittlänge der Hinterpfoten der rechten Seite. Beim Vergleich der rechten und linken Körperseite innerhalb der jeweiligen Tiergruppe ergab sich bei der Wildtyp-Vehikelkontrolle zu 75 mg unerwarteterweise eine unterschiedliche Schrittlänge der Vorder- als auch der Hinterpfoten, während bei der DYT1-Vehikelkontrolle zu 100 mg Unterschiede in der Schrittlänge der Hinterpfoten festgestellt wurden (s. Abb. 31 sowie 32 A und B).

Die Applikation von Pilocarpin hatte bei Wildtyp-Mäusen keinen Einfluss auf den *Abstand* zwischen den Vorder- und Hinterpfoten der rechten und linken Körperseite. Bei DYT1-Mäusen hingegen war der Abstand der Vorderpfoten nach Applikation von 75 mg/kg sowie der Abstand der Hinterpfoten nach Applikation von 75 bzw. 125 mg/kg im Vergleich zur Vehikelgabe signifikant verkleinert. Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen wurden diesbezüglich nicht festgestellt (nicht dargestellt).

Unterschiede im *Abstand zwischen der Vorder- und der Hinterpfote* einer Körperseite (Fußung) sind auf der linken Körperseite nach Applikation von Pilocarpin im Vergleich zur Vehikelgabe bei beiden Versuchsgruppen nicht aufgetreten. Für die rechte Körperseite zeigte sich nur bei den Wildtyp-Tieren ein signifikant kleinerer Abstand in der Fußung nach Applikation von 125 mg/kg Pilocarpin im Vergleich zur Vehikelapplikation. Beim Vergleich der transgenen DYT1-Tiere mit den Wildtyp-Tieren waren ebenfalls keine Unterschiede nachweisbar (nicht dargestellt).



Abb. 30: Activity Cage. Effekte einer akuten Pilocarpingabe im Vergleich zur Vehikelkontrolle auf A) die horizontale lokomotorische Aktivität (Transitions) sowie (B) die vertikale lokomotorische Aktivität (Rearings). Die Werte von 7 (75 und 125 mg) bzw. 9 (100 mg) DYT1-Mäusen (grau) und 9 (75 und 125 mg) bzw. 10 (100 mg) Wildtyp-Mäusen (weiß) sind als Boxplots dargestellt (Median mit 25./75. Perzentilen und Whisker 10./90. Perzentilen). Die Substanzapplikationen sind schraffiert dargestellt. Zusätzlich sind der M.W. als gestrichelte Linie und Ausreißer als schwarze Punkte (\bullet) abgebildet. Signifikante Unterschiede *innerhalb* der Wildtyp-Gruppe bzw. der DYT1-Gruppe sind mit weißen Kreisen (°p<0,05, °°p<0,01), signifikante Unterschiede *zwischen* Wildtyp- und DYT1-Mäusen sind mit einem Stern (*p<0,05) gekennzeichnet.

		Rota "Latency t	arod to fall" (s)	Grip-streı Griffstä	ength Test Wire-hang Test 180° wärke (g) "Latency to fall" (s)		Test 180° to fall" (s)
		DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp
Pilocarpin 75 mg							
Vehikel	Median	300	300	552	532	60,0	60,0
	(25. / 75.)	(300 / 300)	(242 / 300)	(531 / 575)	(406 / 686)	(60,0 / 60,0)	(60,0 / 60,0)
Pilocarpin	Median	293	262	436	429	60,0	60,0
	(25. / 75.)	(251 / 300)	(221 / 300)	(414 / 540)	(339 / 526)	(60,0 / 60,0)	(60,0 / 60,0)
Pilocarpin 100 mg							
Vehikel	Median	300	300	386	466	60,0	60,0
	(25. / 75.)	(282 / 300)	(293 / 300)	(368 / 490)	(312 / 576)	(60,0 / 60,0)	(60,0 / 60,0)
Pilocarpin	Median	274	300	500	525	60,0	60,0
	(25. / 75.)	(192 / 300)	(220 / 300)	(289 / 578)	(429 / 651)	(60,0 / 60,0)	(60,0 / 60,0)
Pilocarpin 125 mg							
Vehikel	Median	300	300	477	509	60,0	60,0
	(25. / 75.)	(300 / 300)	(300 / 300)	(275 / 549)	(422 / 609)	(60,0 / 60,0)	(60,0 / 60,0)
Pilocarpin	Median	202°	167°°	459	575	60,0	60,0
	(25. / 75.)	(113 / 223)	(113 / 213)	(387 / 598)	(399 / 650)	(60,0 / 60,0)	(60,0 / 60,0)

Tab. 12: Tabellarische Übersicht der Effekte einer einmaligen systemischen Pilocarpinbehandlung (75, 100, 125 mg/kg i.p.) im Vergleich zur Vehikelkontrolle auf die Rotarod-Performance sowie die neuromuskuläre Kraft im Grip-strength Test und im Wire-hang Test. Angegeben sind der Median und die 25./75. Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen Substanz- und Vehikelgabe *innerhalb* der Gruppe transgener DYT1- bzw. der Wildtyp-Mäuse sind mit weißen Kreisen gekennzeichnet (°p<0,05, °°p<0.01).



Abb. 31: Footprint. Effekte einer akuten Pilocarpingabe im Vergleich zur Vehikelkontrolle auf die Schrittlänge der Vorderpfoten der linken Seite (A) und der rechten Seite (B). Die Werte von 7 (75 und 125 mg) bzw. 9 (100 mg) DYT1-Mäusen (grau) und 9 (75 und 125 mg) bzw. 10 (100 mg) Wildtyp-Mäusen (weiß) sind als Boxplots dargestellt (Median mit 25./75. Perzentilen und Whisker 10./90. Perzentilen). Die Substanzapplikationen sind schraffiert dargestellt. Zusätzlich sind der M.W. als gestrichelte Linie und Ausreißer als schwarze Punkte (\bullet) abgebildet. Signifikante Unterschiede *innerhalb* der Wildtyp-Gruppe bzw. der DYT1-Gruppe sind mit weißen Kreisen (°p<0,05, °°p<0,01), signifikante Unterschiede zwischen der rechten und linken Seite *innerhalb* der beiden Tiergruppen sind mit einem Plus (^{*}p<0,05) gekennzeichnet.



Abb. 32: Footprint. Effekte einer akuten Pilocarpingabe im Vergleich zur Vehikelkontrolle auf die **Schrittlänge der Hinterpfoten der linken Seite (A) und der rechten Seite (B).** Die Werte von 7 (75 und 125 mg) bzw. 9 (100 mg) DYT1-Mäusen (grau) und 9 (75 und 125 mg) bzw. 10 (100 mg) Wildtyp-Mäusen (weiß) sind als Boxplots dargestellt (Median mit 25./75. Perzentilen und Whisker 10./90. Perzentilen). Die Substanzapplikationen sind schraffiert dargestellt. Zusätzlich sind der M.W. als gestrichelte Linie und Ausreißer als schwarze Punkte (•) abgebildet. Signifikante Unterschiede *innerhalb* der Wildtyp-Gruppe bzw. der DYT1-Gruppe sind mit weißen Kreisen (°p<0,05, °°p<0,01), signifikante Unterschiede zwischen der rechten und linken Seite *innerhalb* beider Tiergruppen sind mit einem Plus (⁺p<0,05) gekennzeichnet.

Beim *Pilocarpin-Score*, der zur Beurteilung der substanzbedingten Nebenwirkungen erhoben wurde, zeigte sich wie erwartet nach Pilocarpingabe bei beiden Versuchsgruppen eine signifikante Erhöhung der Scores im Vergleich zur Vehikelapplikation. Hierbei war v.a. der Parameter Hypolokomotion/Akinesie erhöht, welcher sich v.a. beim Activity Cage, der Rotarod-Performance, aber auch dem Footprint Test bemerkbar machte. Signifikante Unterschiede zwischen den DYT1-Mäusen und den Wildtyp-Tieren konnten jedoch nicht festgestellt werden.



Abb. 33: Pilocarpin-Score. Effekte einer akuten Pilocarpingabe im Vergleich zur Vehikelkontrolle auf die Scores Hypolokomotion, Rigidität, Ataxie und Salivation (die Scores der einzelnen Parameter wurden für jedes Tier addiert). Die Werte von 7 (75 und 125 mg) bzw. 9 (100 mg) DYT1-Mäusen (grau) und 9 (75 und 125 mg) bzw. 10 (100 mg) Wildtyp-Mäusen (weiß) sind als Boxplots dargestellt (Median mit 25./75. Perzentilen und Whisker 10./90. Perzentilen). Die Substanzapplikationen sind schraffiert dargestellt. Zusätzlich sind der M.W. als gestrichelte Linie und Ausreißer als schwarze Punkte (●) abgebildet. Signifikante Unterschiede *innerhalb* der Wildtyp-Gruppe bzw. der DYT1-Gruppe sind mit weißen Kreisen (°p<0,05, °°p<0,01) gekennzeichnet.

4.2.2.2. Tägliche systemische Applikation von Pilocarpin über einen Zeitraum von 21 Tagen

Eine längerfristige Manipulation des cholinergen Systems wurde in einer weiteren Gruppe von DYT1- sowie Wildtyp-Mäusen (jeweils n=10) untersucht. Hierzu wurde Pilocarpin den Versuchsgruppen über einen Zeitraum von 21 Tagen täglich i.p. appliziert. Die Auswahl der Dosierung von 100 mg/kg basiert auf Ergebnissen des akuten Versuches, bei denen diese Dosis im Gegensatz zu 125 mg/kg weniger stark ausgeprägte substanzbedingte Nebenwirkungen hatte und die Gefahr der Entwicklung von Konvulsionen aufgrund des kumulativen Effekts im Rahmen einer Langzeitbehandlung geringer eingeschätzt wurden. Die Substanzapplikation erfolgte erneut in Kombination mit N-Methyl Scopolamin (1 mg/kg).

Im Laufe der 21 tägigen Behandlungsphase wurden die Tiere bezüglich ihres Verhaltens und ihrer motorischen Fähigkeiten an Tag 7, 14 und 21 getestet und die Daten mit denen der vor den Substanzapplikationen erfolgten Vehikelkontrolle (Tag 1) verglichen.

Mit der Überprüfung der *neurologischen Reflexe* an Tag 1, also der Vehikelkontrolle, erwies sich die Vitalität aller Tiere als ungestört. Auch an Tag 7 der 21 tägigen Behandlungsphase hatte die Substanz keinerlei Effekte auf die Reflexantwort der Tiere. Am 14. Versuchstag zeigten drei DYT1-Mäuse einen verzögerten *Haltungsreflex* sowie zwei dieser Tiere zusätzlich einen verzögerten *Stellungsreflex*. Ein verzögerter Stellungsreflex war auch bei einem Wildtyp-Tier zu beobachten. An Tag 21 wurde bei zwei Wildtyp-Mäusen ein verzögerter Haltungsreflex sowie bei einem transgenen Tier ein verzögerter Stellungsreflex festgestellt. *Lidreflex, Ohrreflex* und *Orientierungssinn* waren über den gesamten Versuchszeitraum bei allen Tieren ungestört.

Die 21tägige Behandlung mit Pilocarpin hatte bei den Wildtyp-Tieren an Tag 21 eine reduzierte *horizontale lokomotorische Aktivität* im Vergleich zur Vehikelkontrolle an Tag 1 zur Folge (s. Abb. 34 A). Bei der DYT1-Gruppe hingegen wurde die horizontale lokomotorische Aktivität durch Substanzgabe nicht beeinflusst. Es gab keine Unterschiede zwischen DYT1-und Wildtyp-Mäusen.

Die *vertikale lokomotorische Aktivität* wurde durch die langfristige Pilocarpingabe im Vergleich zur Vehikelgabe an Tag 1 in beiden Tiergruppen mit Ausnahme von Tag 14 bei der DYT1-Gruppe deutlich reduziert (s. Abb. 34 B). Signifikante Unterschiede *zwischen* den beiden Tiergruppen wurden allerdings nicht festgestellt.

Auch bei der statistischen Auswertung der lokomotorischen Aktivität mittels des Mann-Whitney-U-Tests für die zusammengefassten Werte der Tage 7 bis 21 der Pilocarpin-Behandlung sowie anhand der ermittelten AUC über den gesamten Versuchszeitraum von 21 Tagen konnten keine Unterschiede zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen ermittelt werden.

Die längerfristige Manipulation mit 100 mg/kg Pilocarpin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Koordinationsfähigkeit (*Rotarod*) der Tiere (s. Tab. 13). Die statistische Auswertung der zusammengefassten Werte der Zeitspanne zwischen Tag 7 und Tag 21 mittels Mann-Whitney-U-Test ergab jedoch eine tendenziell schlechtere Rotarod-Performance bei DYT1-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (p=0,058). Auch bei der Auswertung der ermittelten AUC mit anschließendem t-Test konnte eine Tendenz zu einer geringeren Koordinationsfähigkeit bei der DYT1-Gruppe im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe festgestellt werden (p=0,062).

Im *Grip-strength Test* war an Versuchstag 14 und 21 bei den transgenen Tieren sowie an den Tagen 7, 14 und 21 bei den Wildtyp-Tieren eine deutliche Reduktion der Griffstärke durch Pilocarpin im Vergleich zur Vehikelbehandlung an Tag 1 festzustellen (s. Tab. 13). An Tag 21 konnte mittels der statistischen Auswertung eine tendenziell geringere Griffstärke bei DYT1-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ermittelt werden (p=0,054), bei der Auswertung der zusammengefassten Werte aus der Zeitspanne zwischen Tag 7 und 21 der Pilocarpin-Behandlung konnte diese statistische Tendenz jedoch nicht bestätigt werden. Auch die Auswertung der ermittelten AUC für die gesamte Versuchsdauer von 21 Tagen ergab keine Unterschiede zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen.

Im *Wire-hang Test* waren weder bei einer Drehung um 90° (nicht dargestellt), noch bei einer Drehung um 180° (s. Tab. 13) signifikante Unterschiede sowohl zwischen der Vehikel- und Substanzapplikation innerhalb der Tiergruppen, als auch zwischen den beiden Tiergruppen zu erkennen. Die statistischen Auswertungen mittels Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der zusammengefassten Werte der beiden Tiergruppen in der Zeitspanne von Tag 7 bis 21 der Langzeitbehandlung, als auch die AUC mit nachfolgendem t-Test ergaben ebenfalls keine Unterschiede. An Tag 14 war jedoch ein transgenes Tier auffällig, da es nicht in der Lage war, sich am Drahtgitter festzuhalten, sodass es bereits bei einer Drehung um 90° nach nur 13 s herabfiel.

Aufgrund der lediglich moderaten Veränderungen des Gangbildes sowie der nicht reproduzierbaren und inhomogenen Ergebnisse des Footprint-Tests im Rahmen der Untersuchungen zur akuten Pilocarpin-Verabreichung wurde auf eine Auswertung des Footprint-Tests während der chronischen systemischen Applikation von Pilocarpin verzichtet.



Abb. 34: Activity Cage. Effekte einer Langzeitbehandlung mit Pilocarpin (100 mg/kg) über einen Zeitraum von 21 Tagen auf (A) die horizontale (Transitions) sowie (B) die vertikale (Rearings) lokomotorische Aktivität im Vergleich zur Vehikelkontrolle an Tag 1. Die schwarzen Vierecke kennzeichnen die transgenen DYT1-Mäuse, während die grauen Vierecke die Wildtyp-Tiere markieren. Die Daten sind als M.W. ± S.E. dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Vehikelkontrolle und den einzelnen Testtagen während des Behandlungszeitraumes *innerhalb* der Wildtyp- bzw. der DYT1-Gruppe sind mit weißen Kreisen (°p<0,05, °°p<0,01) gekennzeichnet.

		Rota "Latency	arod to fall" (s)	Grip-stre Griffstå	ngth Test ärke (g)	th Test Wire-hang Test 180° (e (g) "Latency to fall" (s)	
		DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp
Injektionstag 1							_
Vehikel	M.W. ± S.E.	255 ± 21,8	295 ± 3,97	727 ± 41,7	774 ± 28,8	60,0 ± 0,00	60,0 ± 0,00
Injektionstag 7							
Pilocarpin	M.W. ± S.E.	268 ± 18,7	276 ± 13,8	689 ± 56,2	662 ± 41,3°°	60,0 ± 0,00	56,6 ± 2,31
Injektionstag 14							
Pilocarpin	M.W. ± S.E.	204 ± 22,4	266 ± 14,0	504 ± 46,3°°	604 ± 44,7°°	54,0 ± 6,00	60,0 ± 0,00
Injektionstag 21							
Pilocarpin	M.W. ± S.E.	273 ± 11,0	292 ± 5,53	387 ± 40,9°°	458 ± 29,9°°	59,8 ± 0,63	60,0 ± 0,00

Tab. 13: Tabellarische Übersicht der Effekte einer täglichen Pilocarpinbehandlung (100 mg/kg i.p.) über einen Zeitraum von 21 Tagen im Vergleich zur Vehikelkontrolle an Tag 1 auf die Rotarod-Performance sowie die neuromuskuläre Kraft im Grip-strength Test und dem Wire-hang Test. Die einzelnen Daten sind als M.W. ± S.E. angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen Substanz- bzw. Vehikelgabe *innerhalb* der Gruppe transgener DYT1-Mäuse bzw. der Wildtyp-Mäuse sind mit weißen Kreisen (°°p<0,01) gekennzeichnet.

Unter Langzeitbehandlung über 21 Tage waren bei beiden Gruppen die erwarteten Pilocarpin-Effekte im Vergleich zur Vehikelkontrolle an Tag 1 in Form von signifikant erhöhten Scores aufgetreten. Interessanterweise konnte hier aber an Tag 7 eine Tendenz zu einem höheren Pilocarpin-Score bei DYT1-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren festgestellt werden. Dies wurde jedoch an den folgenden Testtagen sowie bei der Betrachtung der zusammengefassten Werte der Zeitspanne zwischen Testtag 7 und 21 nicht bestätigt. Beim Vergleich der beiden Tiergruppen über den gesamten Verlauf von 21 Tagen konnten anhand der ermittelten AUC ebenfalls keine Unterschiede festgestellt werden.



Abb. 35: Pilocarpin-Score. Effekte einer Langzeitbehandlung mit Pilocarpin (100 mg/kg i.p./d) über einen Zeitraum von 21 Tagen auf die Scores Hypolokomotion, Rigidität, Ataxie und Salivation (die Scores der einzelnen Parameter wurden für jedes Tier addiert) im Vergleich zur Vehikelkontrolle an Tag 1. Die schwarzen Vierecke kennzeichnen die transgenen DYT1-Mäuse, während die grauen Vierecke die Wildtyp-Tiere markieren. Die Daten sind als M.W. \pm S.E. dargestellt. Signifikante Unterschiede *innerhalb* der Wildtyp- bzw. der DYT1-Gruppe sind mit weißen Kreisen (°°p<0,01), eine statistische Tendenz *zwischen* Wildtyp- und DYT1-Mäusen ist mit einer Raute ([#]p=0,095) gekennzeichnet.

Abschließend bleibt festzustellen, dass weder im Rahmen der akuten systemischen Applikation von Pilocarpin, noch mittels der Langzeitbehandlung mit Pilocarpin über einen Zeitraum von 21 Tagen, eines der Hauptziele, nämlich das Provozieren einer Dystonie-Symptomatik im DYT1-Mausmodell, erreicht werden konnte.
4.2.2.3. Striatale Mikroinjektionen von Pilocarpin

Zur direkten lokalen pharmakologischen Manipulation von mAChR im Striatum wurden intrastriatale Mikroinjektionen mit 50 bzw. 25 µg/0,5 µl/Hemisphäre Pilocarpin bei neun DYT1-Mäusen und neun bis zehn Wildtyp-Tieren vorgenommen.

Alle DYT1- und Wildtyp-Mäuse wurden zunächst mit Pilocarpin in einer Dosierung von 50 µg/0,5 µl/Hemisphäre behandelt. Unmittelbar nach Substanzapplikation entwickelten vier Wildtyp-Tiere $(3^{\circ}_{2}, 1^{\circ}_{2})$ mindestens einen fokalen bis hin zu einem epileptischen Anfall. Diese Pilocarpin-induzierten Anfälle äußerten sich initial durch Akinesie, Tremor, Ataxie sowie gustatorische Automatismen mit Salivation, gefolgt von motorisch limbischen Anfällen (Vorderextremitätenmyoklonus, Aufrichten und teilweise sogar Umfallen). Des Weiteren konnten zusätzlich stereotype Verhaltensweisen wie Putzen, wiederholtes Kopfzucken sowie plötzliches Hochspringen beobachtet werden. Dies entspricht der Beschreibung von epileptischen Anfällen bei Mäusen nach Pilocarpingabe in der Literatur (Turski et al., 1984). Da diese Tiere aufgrund der epileptischen Anfälle in der Ausführung der motorischen Tests stark beeinträchtigt waren, wurden sie nur im Activity Cage beobachtet. Auf eine Kontrolle der neurologischen Reflexe sowie die Durchführung des Rotarod-, Wire-hang, Grip-strength sowie Footprint-Tests wurde verzichtet. Ein weiteres Wildtyp-Tier (♂) sowie eine DYT1-Maus (\mathcal{E}) mussten zudem aufgrund eines Status epilepticus euthanasiert werden. Insgesamt gingen somit lediglich acht DYT1-Mäuse (5 $^{\circ}$, 3 $^{\circ}$) sowie fünf Wildtyp-Tiere (2 $^{\circ}$, 3 $^{\circ}$) in die statistische Auswertung mit ein.

Dieselben neun DYT1-Mäuse (eine Maus wurde als Ersatz für das euthanasierte Tier ergänzt) und neun Wildtyp-Tiere wurden im Anschluss an eine zweiwöchige Rekonvaleszenzzeit erneut mit Pilocarpin, aber in einer niedrigeren Konzentration von 25 μ g/0,5 μ l/Hemisphäre behandelt. Diesmal waren im Vergleich zur höheren Dosierung trotz der zweiwöchigen Erholungsphase sogar noch mehr Tiere von epileptischen Anfällen betroffen: sechs DYT1-Mäuse (2, 4, d) und vier Wildtyp-Mäuse (2, 2, d) entwickelten aufgrund der Pilocarpin-Mikroinjektionen mindestens fokale epileptische Anfälle und wurden wiederum nur im Activity Cage beobachtet. Die oben genannten weiteren Tests wurden bei diesen Mäusen ebenfalls nicht durchgeführt. Hierdurch war es nicht möglich, eine statistisch auswertbare Gruppengröße (n= oder >5) für diese Tests zu erreichen. Im Folgenden werden daher lediglich die Effekte der intrastriatalen Mikroinjektion von 50 μ g/0,5 μ l/Hemisphäre Pilocarpin auf das Verhalten und die Motorik transgener DYT1-Mäuse und Wildtyp-Tiere beschrieben. Bei der Untersuchung der *neurologischen Reflexe* war nach Applikation von 50 µg/0,5 µl/Hemisphäre Pilocarpin bei zwei DYT1-Mäusen ein verzögerter *Haltungsreflex* aufgetreten. *Stellungsreflex, Lidreflex, Ohrreflex* und *Orientierungsreflex* waren nach Substanzgabe bei allen untersuchten Tieren ungestört. Vehikelbehandelte DYT1- und Wildtyp-Mäuse zeigten keine Auffälligkeiten bei der Überprüfung der Reflexe.

Wie aus Abb. 36 ersichtlich, bewirkte die intrastriatale Gabe von Pilocarpin (50 µg/Hem.) eine signifikante Reduktion der vertikalen und horizontalen *lokomotorischen Aktivität* bei DYT1-Mäusen im Vergleich zur Vehikelgabe. Bei Wildtyp-Tieren hatte die Substanzgabe hingegen keinen Einfluss auf die lokomotorische Aktivität. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen waren sowohl nach Substanz- als auch nach Vehikelapplikation nicht nachweisbar.



50 μg/0,5 μl/Hem. Pilocarpin



Abb. 36: Activity Cage. Effekte einer intrastriatalen Mikroinjektion von Pilocarpin (50 µg/0,5 µl/Hem.) im Vergleich zur Vehikelkontrolle auf (A) horizontale lokomotorische die Aktivität (Transitions) sowie (B) die vertikale lokomotorische Aktivität (Rearings). Die Werte von 8 DYT1 Mäusen (grau) und 5 Wildtyp-Tieren (weiß) sind als Boxplots dargestellt (Median mit 25./75. Perzentilen und Whisker 10./90. Perzentilen). Die Substanzapplikationen sind schraffiert dargestellt. Zusätzlich ist der M.W. als gestrichelte Linie abgebildet. Signifikante Unterschiede innerhalb der Wildtyp-Gruppe bzw. der DYT1 Gruppe sind mit weißen Kreisen (°°p<0,01) gekennzeichnet.

Die *Rotarod-Performance* der Tiere innerhalb beider Versuchsgruppen war durch die intrastriatale Gabe von Pilocarpin im Vergleich zur Vehikelgabe nicht beeinträchtigt. Es zeigte sich aber eine Tendenz zu einer reduzierten Koordinationsfähigkeit (p=0,093) bei transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nach Substanzapplikation.

Die intrastriatale Applikation von Pilocarpin hatte weder im *Grip-strength Test*, noch im *Wire-hang Test* signifikante Effekte zur Folge.

Der Footprint Test wurde wie bereits bei der täglich systemischen Applikation von Pilocarpin (s. Punkt 4.2.2.2. unter *Footprint*) nicht ausgewertet.

Pilocarpin 50 μg/0,5 μl/Hemisphäre		Median (25. / 75.)	
		Vehikel	Pilocarpin
Rotarod "Latency to fall" (s)	DYT1	271 (192 / 300)	156 (113 / 222)
	Wildtyp	295 (223 / 298)	239 (190 / 285)
Grip-strength Test Griffstärke (g)	DYT1	585 (531 / 654)	524 (447 / 598)
	Wildtyp	578 (444 / 756)	537 (488 / 569)
Wire-hang Test 180° "Latency to fall" (s)	DYT1	60 (0,00 / 0,00)	60 (0,00 / 0,00)
	Wildtyp	60 (0,00 / 0,00)	60 (0,00 / 0,00)

Tab. 14: Tabellarische Übersicht der Effekte einer intrastriatalen Mikroinjektion mit 50 μg/0,5 μl/Hem. Pilocarpin im Vergleich zur Vehikelkontrolle auf die Rotarod-Performance sowie die neuromuskuläre Kraft im Grip-strength Test und dem Wire-hang Test. Angegeben sind der Median und die 25./75. Perzentile.

Im Hinblick auf die substanzbedingten Nebenwirkungen im *Pilocarpin-Score* führte die striatale Mikroinjektion von Pilocarpin zu signifikant höheren Scores bei DYT1-Mäusen im Vergleich zur Vehikelgabe. Bei den Wildtyp-Tieren konnten keine signifikanten Effekte durch Pilocarpingabe im Vergleich zur Vehikelapplikation hervorgerufen werden. Auch zwischen den beiden Tiergruppen lagen keine signifikanten Effekte vor.



50 µg/0,5 µl/Hem. Pilocarpin

Abb. 37: Pilocarpin-Score. Effekte einer intrastriatalen Mikroinjektion von Pilocarpin (50 µg/0,5 µl/Hem.) im Vergleich zur Vehikelkontrolle auf die Scores Hypolokomotion, Rigidität, Ataxie und Salivation (die Scores der einzelnen Parameter wurden für jedes Tier addiert). Die Werte von 8 DYT1-Mäusen (grau) und 5 Wildtyp-Tieren (weiß) sind als Boxplots dargestellt (Median mit 25./75. Perzentilen und Whisker 10./90. Perzentilen). Die Substanzapplikationen sind schraffiert dargestellt. Zusätzlich ist der M.W. als gestrichelte Linie abgebildet. Signifikante Unterschiede *innerhalb* der Wildtyp-Gruppe bzw. der DYT1-Gruppe sind mit weißen Kreisen (°°p<0,01) gekennzeichnet.

Auch mit der direkten striatalen pharmakologischen Manipulation von mAChR war es nicht gelungen, dystone Bewegungsstörungen bei transgenen DYT1-Mäusen zu provozieren.

4.2.3. Immunhistochemische Untersuchung striataler cholinerger Interneurone in DYT1-Mäusen

Parallel zu den verhaltenspharmakologischen Untersuchungen wurden immunhistochemische Analysen an fünf DYT1- und sechs Wildtyp-Mäusen durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine erhöhte Dichte striataler cholinerger Interneurone Grund für die vermutete cholinerge Überaktivität sein könnte. Hierbei diente die Cholinacetyltransferase (ChAT), das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Biosynthese des ACh, als zuverlässiger Marker für striatale cholinerge Interneurone.

Nach transkardialer Perfusion der Tiere in einem Alter von ca. 12 Monaten wurden die Gehirne immunhistochemisch behandelt (Methode s. Kap. 3.2.2.5.). Die Auszählung der ChAT-immunreaktiven (ChAT⁺) Interneurone wurde an codierten Objektträgern vorgenommen, damit der Untersucher keine Kenntnis über die Gruppenzugehörigkeit der jeweiligen Schnitte hatte. Nach Ermittlung aller Werte wurden die Schnitte entschlüsselt und den jeweiligen Tiergruppen zugeordnet.

Zur Zählung der striatalen ChAT-immunreaktiven Zellen wurde das Striatum anhand des stereotaktischen Atlas für das Mäusegehirn (Franklin und Paxinos, 2008) in eine anteriore (1,8 bis 1,1 mm relativ zu Bregma), eine mediale (1,1 bis 0,1 mm relativ zu Bregma) sowie eine posteriore Region (0,1 bis + 0,7 mm relativ zu Bregma) unterteilt. Der mediale Bereich des Striatums wurde wiederum in vier weitere Kompartimente (dorsomedial, dorsolateral, ventromedial und ventrolateral) differenziert (s. Abb. 11).

Zur Quantifizierung der striatalen cholinergen Interneurone wurde aus beiden Gehirnhälften jeden Schnittes ein mittiger Bildausschnitt pro Subregion unter der 400-fachen Vergrößerung mit Hilfe eines Bildanalysesystems ausgezählt. Anschließend konnte die Dichte der ChAT⁺- Interneurone basierend auf der Messung der Flächen der ausgezählten Bildausschnitte (0,296 mm x 0,222 mm) und der bekannten Schnittdicke (0,04 mm) (Dichte [Neurone] = (Anzahl der gezählten Neurone x 380,23)/mm³) errechnet werden (Erläuterung s. Punkt 3.2.2.5.). Die Werte der jeweiligen Region pro Tier und Gehirnhälfte wurden in Form des arithmetischen Mittels (M.W.) und des Standardfehlers (S.E.) statistisch ausgewertet (s. tabellarischer Anhang).

Nachdem die Werte der rechten und linken Gehirnhälfte bei DYT1- und Wildtyp-Mäusen mit Hilfe eines gepaarten t-Tests verglichen wurden und hierbei keine signifikanten Unterschiede auftraten, wurden für die folgenden Auswertungen die Mittelwerte aus jeweils beiden Gehirnhälften zusammengefasst.

Zunächst erfolgte eine Betrachtung der Morphologie der cholinergen Interneurone. Wie aus Abb. 40 A und B ersichtlich, stimmten die ChAT⁺-Interneurone im Striatum transgener DYT1-Mäuse und Wildtyp-Tiere in ihren morphologischen Eigenschaften mit früheren Beschreibungen von ChAT⁺-Interneurone bei Nagern überein (Kawaguchi et al., 1997; Hamann et al., 2006). Die cholinergen Interneurone wiesen ca. 20 µm große polygonale spindelförmige Zellkörper mit wenigen, spärlich bedornten Hauptdendriten auf. Da es sich bei diesen Abbildungen lediglich um zweidimensionale Schnitte einer dreidimensionalen Form handelt, sind einzelne Strukturen z.T. nur angeschnitten dargestellt. Aufgrund dessen sind die in der Literatur beschriebenen drei bis sechs Ausläufer der Zelle, die sich meist über mehrere Schnittebenen erstrecken, auf diesen Abbildungen häufig nur teilweise zu erkennen. In einigen Schnitten, wie auch in Abb. 40 A und B zu sehen, waren die großen Zellkerne der cholinergen Interneurone sichtbar, die in Form einer hellen ovalen Struktur im Zellinneren angeordnet waren. Unterschiede hinsichtlich der Größe oder der dendritischen Verzweigungen cholinerger Interneurone waren zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen nicht nachweisbar. Der in früheren Studien an Nagern beschriebene Gradient in der Verteilung cholinerger Interneurone (Hamann et al., 2006; Schlösser et al., 1999; van Vulpen und van der Kooy, 1998), auf den weiter unten genauer eingegangen wird, konnte bei der Auszählung der ChAT⁺-Zellen ebenfalls bestätigt werden.



Abb. 38: Histologische Abbildungen des linken Striatums einer DYT1- (A) und einer Wildtyp-Maus (B) bei 25-facher Vergrößerung nach Markierung der ChAT⁺-Interneurone. Das sich im Bildzentrum befindende Striatum ist von schwarz markierten ChAT⁺-Nervenzellen durchsetzt, die sich in dieser Vergrößerung nur als feine dunkle Punkte darstellen. In den folgenden Abb. 39 und 40 der stärkeren Vergrößerungen aus dem eingerahmten Feld werden sie deutlicher sichtbar. Der hell abgesetzte Corpus Callosum (CC) bildet die Grenze zum Kortex (Kx). Zur Medianen wird das Striatum vom lateralen Ventrikel (LV) begrenzt. Dargestellt sind Gehirnschnitte der AP-Ebene +1,20 (mm relativ zu Bregma). Der Rahmen markiert den Ausschnitt, aus dem die weiteren Vergrößerungen (100- und 400-fach, Abb. 39 und 40) entnommen wurden. Die Länge der Referenzbalken entspricht 500 μ m im histologischen Schnitt.



Abb. 39: Histologische Abbildungen des dorsomedialen Striatums (s. Abb. 38) einer DYT1- (A) und einer Wildtyp-Maus (B) bei 100-facher Vergrößerung. Die ChAT⁺-Interneurone sind als schwarz markierte Zellen nun deutlich zu erkennen. Die Länge der Referenzbalken entspricht 100 μ m im histologischen Schnitt.



Abb. 40: Histologische Abbildungen eines Ausschnittes des dorsomedialen Striatums (s. Abb. 38) von einer DYT1- (A) und einer Wildtyp-Maus (B) unter 400-facher Vergrößerung. Die in der Literatur mit bis zu 40 µm beschriebene Zellgröße der polygonalen spindelfömigen Somata kann anhand der 25 µm langen Referenzbalken bestätigt werden. Die meist drei bis sechs glatten oder spärlich bedornten Hauptdendriten der Zelle sind auf den Abb. dieser Schnittebene hingegen nur angedeutet dargestellt. Die schwarzen Pfeile markieren cholinerge Interneurone, deren Zellkerne als helle ovale Struktur im Zellinneren deutlich zu erkennen sind.

Auch die Dichte ChAT⁺-Interneurone im Striatum erschien bei beiden Tiergruppen vergleichbar, was durch die statistische Auswertung bestätigt wurde: DYT1-Mäuse hatten eine durchschnittliche Dichte von 494 \pm 19 Neuronen/mm³, die Wildtyp-Tiere von 533 \pm 17 Neuronen/mm³. Bezogen auf das Gesamtstriatum bestanden somit keine signifikanten Unterschiede zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen (p=0,129, s. Abb. 41).



Abb. 41: Dichte striataler cholinerger Interneurone im Gesamtstriatum von DYT1-Mäusen (schwarzer Balken) und Wildtyp-Tieren (grauer Balken). Die Daten sind als M.W. + S.E. der durchschnittlichen Anzahl der rechten und linken Hemisphäre von 5 DYT1- und 6 Wildtyp-Tieren dargestellt. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen (p=0,129).

Bei der Betrachtung der Subregionen hingegen wurde eine signifikant reduzierte Dichte cholinerger Interneurone im Bereich des **dorsomedialen Striatums** bei DYT1-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren festgestellt. In dieser Region betrug die Dichte der ChAT⁺-Interneurone bei den DYT1-Mäusen durchschnittlich 760 ± 50 Neurone/mm³, bei den Wildtyp-Tieren hingegen 889 ± 39 Neurone/mm³. Damit war die Dichte cholinerger Interneurone bei DYT1-Mäusen in dieser Region des Striatums um 15 % (p=0,040) geringer als bei Kontrolltieren.

Bei den anderen untersuchten Subregionen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen verzeichnet werden:

Im anterioren Striatum wiesen die transgenen Tiere eine mittlere Dichte cholinerger Interneurone von 608 ± 70 Neuronen/mm³ auf, die Wildtyp-Tiere hatten 744 ± 81 Neurone/mm³ (p=0,217).

Im **dorsolateralen Striatum** wurde bei DYT1-Mäusen eine durchschnittliche Dichte von 489 \pm 40 Neuronen/mm³, bei Wildtyp-Mäusen von 527 \pm 38 Neuronen/mm³ (p=0,490) errechnet.

Im **ventromedialen Striatum** betrug die mittlere Dichte cholinerger Interneurone bei DYT1-Mäusen 416 \pm 36 Neurone/mm³, bei Wildtyp-Tieren 466 \pm 33 Neurone/mm³ (p=0,299).

Im **ventrolateralen Striatum** hatten DYT1-Mäuse eine durchschnittliche Dichte von 266 \pm 31 Neuronen/mm³, Wildtyp-Mäuse hatten 242 \pm 24 Neurone/mm³ (p=0,539).

Im **posterioren Striatum** war die mittlere Dichte cholinerger Interneurone bei DYT1-Mäusen mit 515 \pm 53 Neuronen/mm³ und Wildtyp-Tieren mit 440 \pm 42 Neuronen/mm³ ebenfalls vergleichbar (p=0,256).

Wie bereits in früheren Studien zu striatalen Interneuronen bei Nagern beschrieben (Hamann *et al.*, 2006; Schlösser *et al.*, 1999; van Vulpen und van der Kooy, 1998), ist auch in Abb. 42 ein deutlicher anterior-posteriorer, dorso-ventraler sowie medio-lateraler Gradient in der Verteilung cholinerger Interneurone im Striatum der transgenen DYT1-Mäuse, als auch der Wildtyp-Tiere zu erkennen.



Abb. 42: Dichte striataler cholinerger Interneurone in den untersuchten striatalen Subregionen von DYT1-Mäusen (schwarze Balken) und Wildtyp-Tieren (graue Balken). Das Striatum wurde in Anlehnung an frühere Studien in 6 Subregionen unterteilt: das anteriore (a), das mediale (dorsomedial, dm; dorsolateral, dl; ventromedial, vm; ventrolateral, vl) und das posteriore (p) Striatum. Die Daten sind als M.W. + S.E. der durchschnittlichen Anzahl der rechten und linken Hemisphäre von 5 DYT1- und 6 Wildtyp-Tieren dargestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen ist mit einem Stern (*p = 0,040, -15%) gekennzeichnet.

4.2.4. Westernblot-Analyse der Cholinacetyltransferase

Um zusätzlich Aufschluss über mögliche Veränderungen des cholinergen Systems in anderen Gehirnregionen als dem Striatum bei DYT1-Mäusen zu erlangen, wurden ergänzend zu den immunhistochemischen Untersuchungen Westernblot-Analysen der ChAT-Expression bei jeweils fünf DYT1- und Wildtyp-Mäusen mittels der unter Punkt 3.2.2.6. beschriebenen Methoden durchgeführt. Als zu untersuchende Gewebe wurden vier Gehirnregionen ausgewählt: Kortex, Striatum, Cerebellum und Hirnstamm.



Abb. 43: Dargestellt ist die **Expression von ChAT in den 4 unterschiedlichen Gehirnregionen** (Kortex, Striatum, Cerebellum und Hirnstamm) sowohl bei transgenen DYT1-Mäusen als auch Wildtyp-Tieren. Beispielhaft ist hier jeweils die 68 kDa Bande dargestellt. Als Ladekontrolle, hier zum Beispiel für das Striatum abgebildet, wurde β-Actin mit einer Bande bei 45 kDa verwendet.

Die Abb. 43 zeigt die Expression von ChAT in immunreaktiven Banden der vier untersuchten Gehirnregionen sowohl bei transgenen DYT1- als auch Wildtyp-Mäusen. Beispielhaft ist jeweils die 68 kDa Bande dargestellt. Es wurden außerdem vier weitere Banden in Höhe von 31, 36, 56, sowie 71 kDa ermittelt (nicht dargestellt), die alle auch in der Literatur im Rahmen von Westernblot-Analysen von ChAT im Mäusegehirn beschrieben wurden (Badamchian *et al.*, 1986; Bulloch *et al.*, 1994; Jamal *et al.*, 2009).

In Vorversuchen wurden darüber hinaus zwei weitere Banden in Höhe von 15 und 16 kDa detektiert, die für die weiteren Untersuchungen aber nicht berücksichtigt wurden, da die Gelelektrophorese zur Optimierung der Auftrennung einzelner Banden erst beendet wurde, wenn die 25 kDa Bande des Markers die untere Kante des Gels erreicht hatte und somit Proteine mit einem geringerem Gewicht bereits aus dem Gel ausgelaufen waren. β-Actin mit einer Bande in Höhe von 45 kDa wurde als Ladekontrolle (s. Abb. 43) verwendet. Obwohl deutliche individuelle Unterschiede in der Expression der ChAT sowohl *innerhalb* der Gruppe der DYT1- als auch der Wildtyp-Tiere zu verzeichnen waren, gab es keine deutlichen Unterschiede *zwischen* den beiden Tiergruppen. Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse für das Striatum bestätigen zudem die zuvor beschriebenen Ergebnisse der Immunhistochemie, bei der, bezogen auf das Gesamtstriatum (s. Abb. 41), ebenfalls keine Unterschiede zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen festgestellt wurden.

5. DISKUSSION

5.1. Aspekte zur Methodik

5.1.1. Untersuchungen im *dt^{sz}*-Hamster

5.1.1.1. Induktion und Beurteilung der Bewegungsstörungen beim dtsz-Hamster

Bei der dtsz-Hamstermutante können dystone Episoden bereits durch milden Stress ausgelöst werden. Da die Art der Stimuli einen Einfluss auf die Latency on haben könnte, sollten die Stimuli zur Induktion der Dystonie während der gesamten Versuchsdurchführung stets konstant gehalten werden. Aus diesem Grund wurde in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen die von Löscher et al. (1989) eingeführte "triple stimulation technique" verwendet, wodurch sich reproduzierbare Schweregrade bei den Tieren ergaben. Die innerhalb der drei Beobachtungsstunden maximal erreichten Schweregrade konnten daraufhin mittels des etablierten Score-Systems (s. Kap. 3.2.1.1.) zuverlässig beurteilt und ausgewertet werden. Frühere Untersuchungen mit nicht-dystonen Kontrolltieren zeigten, dass die in Stadium 1 des Score-Systems beobachtete abgeflachte Körperhaltung der Tiere keine Bewegungsstörung darstellt (Fredow und Löscher, 1991), sondern vielmehr Ausdruck von Angstverhalten infolge des Umsetzens in eine neue Umgebung zu sein scheint. Aufgrund dessen wurde analog zu früheren Arbeiten erst das Stadium 2 zur Auswertung der Latency on herangezogen (Fredow und Löscher, 1991). Da die Ausprägung der Dystonie, wie auch schon von Hamann (2000), Sander (2004) und Rehders (1999) beschrieben, sowohl zwischen den Würfen als auch zwischen den einzelnen Tieren innerhalb eines Wurfes bezüglich der maximal entwickelten Schweregrade variierte, wurden Tiere, deren Schweregrade nicht über das Stadium 2 hinaus gingen bzw. nicht reproduzierbar waren, innerhalb der ersten beiden Testwochen ausselektiert und nicht für die pharmakologischen Untersuchungen verwendet. Darüber hinaus zeigten einige Tiere, vergleichbar einer früheren Studie (Sander, 2004), eine Tendenz zur verzögerten Spontanremission der Dystonie und konnten somit teilweise noch bis zum 44. LT, also noch nach Überschreitung der MAX-Phase, in den Versuchen eingesetzt werden.

Die während des Versuches in Kombination mit dem M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid aufgetretenen Verhaltenseffekte wie Hyperaktivität wurden bereits in vorherigen Studien an *dt^{sz}*-Hamstern beobachtet (Smiljanic, 2010). Eine erhöhte basale lokomotorische Aktivität wurde zudem im Rahmen von Verhaltensuntersuchungen an M4 (^{-/-}) Knockout-Mäusen beschrieben (Gomeza *et al.*, 1999). Das Fehlen bzw. die Blockade der M4-Autorezeptoren führt vermutlich zu einer tonischen Steigerung des extrazellulären ACh-Spiegels, welche in einer abweichenden Lokomotion resultiert (Bonsi *et al.*, 2008). Aufgrund der in den eigenen

Untersuchungen beobachteten Hyperaktivität nach Gabe von Tropicamid, kann davon ausgegangen werden, dass tatsächlich M4-Rezeptoren manipuliert wurden.

5.1.1.2. Tägliche systemische Applikation über einen Zeitraum von 21 Tagen

Im Rahmen der chronisch systemischen Untersuchung über einen Zeitraum von 21 Tagen konnte die Ausselektierung von Tieren mit niedrigen bzw. nicht reproduzierbaren Stadien nicht berücksichtigt werden, da die Applikation der jeweiligen Testsubstanz bereits ab dem 22. LT, also einen Tag nach dem Absetzen der Tiere, erfolgte. Um dennoch einer möglichen Verfälschung der Ergebnisse durch vermeintlich starke Differenzen in der Dystonie-Ausprägung zwischen zwei Würfen entgegenzuwirken, wurden zwei altersgleiche Würfe so aufgeteilt, dass die eine Hälfte eines jeden Wurfes mit der zu untersuchenden Testsubstanz behandelt wurde, während die andere Hälfte des jeweiligen Wurfes das entsprechende Vehikel erhielt. Zur zusätzlichen Minimierung subjektiver Einflüsse auf die Ergebnisse der Untersuchung, erfolgte die Durchführung der Versuche "blind", d.h. die Substanzen wurden vor den Versuchen verschlüsselt, sodass der Untersucher keine Kenntnis darüber hatte, welchen Tieren die Testsubstanz bzw. das Vehikel appliziert wurde. Der Verzicht auf ein vorhergehendes Selektieren der Tiere hatte allgemein keine Auswirkungen auf die Schweregrade der Dystonie bei den dt^{sz}-Hamstern, d.h. die Höhe der Stadien war mit denjenigen der akut systemischen Applikation vergleichbar. Lediglich bei einem Wurf (chronische Applikation von Trihexyphenidyl) wurden etwas niedrigere Stadien über den gesamten Versuchszeitraum von 59 Tagen verzeichnet, sodass diese Tiere wahrscheinlich ausselektiert worden wären. Aufgrund des lediglich eingeschränkten Zeitfensters der MAX-Phase sowie dem langen Behandlungszeitraum über 21 Tage, war dies jedoch nicht möglich, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte.

5.1.1.3. Striatale Mikroinjektionen beim *dt^{sz}*-Hamster

Zur pharmakologischen Manipulation striataler Rezeptoren wurde in dieser Arbeit die bilaterale Mikroinjektion herangezogen, welche sich bereits in früheren Studien als geeignete pathophysiologischen Methode zur Aufklärung der Bedeutung verschiedener Neurotransmittersysteme in Tiermodellen erwies und am hiesigen Institut bei Hamstern, aber auch Mäusen mehrfach erfolgreich angewandt wurde (z.B. Rehders et al., 2000; Hamann und Richter, 2002; Richter, 2007; Sander und Richter, 2007). Die Koordinaten für die chronische Implantation der Führungskanülen bei Hamstern wurden aus früheren Studien (Hamann und Richter, 2002; Sander und Richter, 2007; Smiljanic, 2010) übernommen und anhand eigener Vorversuche unter Zuhilfenahme des stereotaktischen Atlas für das Hamstergehirn (Morin und Wood, 2001) leicht modifiziert. Zielstruktur war hierbei das dorsale Striatum, da in zahlreichen vorangehenden Untersuchungen Veränderungen v.a. in dieser

Subregion aufgezeigt wurden (zur Übersicht: Richter und Löscher, 1998; Richter, 2005). Darüber hinaus wird den dorsalen Anteilen des Striatums eine gewichtige Rolle für die Feinabstimmung der Motorik zugesprochen, wohingegen die ventralen Anteile vielmehr in limbische Funktionen involviert sind (Bolam et al., 2000). Da dieser Arbeit hauptsächlich die Frage nach Effekten auf die motorische Funktion zugrunde lag, erfolgte die lokale Applikation somit in das dorsale, also "motorische" Striatum. Um eine korrekte Applikation in diese Subregion gewährleisten zu können, wurde die Lokalisation der Führungskanülen in einer sich an die pharmakologischen Untersuchungen anschließenden histologischen Aufbereitung der Gehirne mittels Thioninfärbung überprüft. Dementsprechend musste einer von 44 Hamstern aufgrund einer fehlerhaften Lokalisation der Führungskanülen (Perforation des Ventrikels) von der Auswertung ausgeschlossen werden. Da allerdings sowohl in den eigenen Untersuchungen als auch in früheren Studien (Rehders, 1999; Sander, 2004) keine Unterschiede in den Verhaltenseffekten von Substanzen innerhalb des dorsomedialen oder dorsolateralen Striatums festgestellt werden konnten, gingen auch vereinzelt Tiere mit in die statistische Auswertung ein, deren implantierten Führungskanülen sich in den dorsolateralen Anteilen des Striatums befanden. Durch die Anfertigung histologischer Präparate war es zudem möglich, Anzeichen infektiöser Prozesse im Gehirn operierter Tiere aufzudecken, die möglicherweise zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt hätten. Folglich wurden weitere neun Hamster wegen Anzeichen einer Infektion von den statistischen Auswertungen ausgeschlossen. Das mit der Mikroinjektionstechnik applizierte Volumen während der Versuche ließ sich mit Hilfe der in den Schläuchen aufgezogenen Farbstofflösung und der beobachteten Verhaltenseffekte bei beiden Tiermodellen sehr gut kontrollieren. Das für die intrastriatale Injektion beim Hamster gewählte Injektionsvolumen von 0,5 µl/Hemisphäre basiert auf früheren Arbeiten (Rehders et al., 2000) und erscheint hinsichtlich des bei Ratten üblichen striatalen Injektionsvolumens von 1,0 µl/Hemisphäre als angemessen (Wang und McGinty, 1996). Dieses für Ratten angegebene Volumen korreliert mit Angaben vorangegangener Studien, bei denen die zurückgelegte Strecke einer intracerebral applizierten Substanz untersucht und dabei eine Diffusionsstrecke von 1,7 mm nachgewiesen wurde (Martin, 1991). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass mit dem gewählten Injektionsvolumen nicht das gesamte Striatum manipuliert wurde, eine über den dorsalen Bereich des Striatums hinausgehende Wirkung kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Einer Applikation geringerer Volumina widersprach die teilweise nur begrenzte Löslichkeit einiger Substanzen (Tropicamid, Trihexyphenidyl und VU0152100). Unter Berücksichtigung von Tierschutzaspekten bei invasiven Eingriffen und des großen

operativen Aufwandes wurde die Gruppengröße möglichst klein gehalten, indem die Hamster für Untersuchungen von bis zu drei Dosierungen verwendet wurden. Diese Vorgehensweise erscheint im Hinblick auf die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Versuchen

143

(ausreichende Rekonvaleszenzzeit sowie Wash-out Effekt durch alternierende Vehikel-/ Substanzgabe) und die jeweils beobachteten dosierungstypischen Verhaltenseffekte unproblematisch.

5.1.1.4. Rezeptorautoradiographische Untersuchungen

Zur Erfassung möglicher Unterschiede im cholinergen System von dt^{sz}-Hamstern im Vergleich zu nicht-dystonen Kontrollhamstern wurden neben pharmakologischen zusätzlich rezeptorautoradiographische mAChR Untersuchungen Analysen von durchgeführt. Bei der Rezeptorautoradiographie handelt es sich um eine seit vielen Jahrzehnten etablierte in-vitro Methode, die zur Darstellung der Dichte unterschiedlicher Rezeptoren in Gewebeschnitten dient (Quirion et al., 1987). Dadurch ist es möglich Rückschlüsse auf die Gesamtpopulation der zu untersuchenden Rezeptoren zu ziehen, Aussagen über Bindungsaffinitäten unter in-vivo Bedingungen können hierbei jedoch nicht getroffen werden. Ein Vorteil der Rezeptorautoradiographie liegt in der Möglichkeit, die Ligandenbindung einer bestimmten Hirnregion exakt regional zuzuordnen, was z.B. bei Bindungsstudien an Hirnhomogenaten nicht möglich ist. Hauptaugenmerk der hier zugrundeliegenden Untersuchungen war es, Aufschluss über die pathophysiologische Beteiligung einzelner mAChR-Subtypen, insbesondere derjenigen vom Subtyp 1 und 4, am Dystoniegeschehen im *dt*^{sz}-Hamstermodell zu erlangen. Zur Markierung der entsprechenden Rezeptoren wurden die mit Tritium markierten Liganden [H³]-Pirenzepin sowie [H³]-AFDX verwendet. [H³]-Pirenzepin weist eine hohe Selektivität gegenüber mAChR vom Subtyp 1 auf und erwies sich bereits in zahlreichen früheren Studien in Nagern zur Ermittlung der Bindungsaffinität von M1-Rezeptoren als geeignet (z.B. Buckley und Burnstock, 1986; Nastuk und Graybiel, 1988). [H³]-AFDX hingegen ist sowohl gegenüber M2- als auch M4-Rezeptoren selektiv (Piggott et al., 2002), sodass eine eindeutige Unterscheidung dieser beiden Rezeptorsubtypen nicht möglich war, was bei der Interpretation der hier vorgestellten Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Das Ausweichen auf einen anderen Radioliganden mit höherer Selektivität gegenüber M4 war allerdings aufgrund des Mangels an selektiven M4-Antagonisten nicht möglich. Da die Hamster zur Entnahme des Probematerials in Abwesenheit dystoner Episoden dekapitiert wurden, spiegeln die Ergebnisse dieser Untersuchung lediglich den Zustand unter basalen Bedingungen wider. Sekundäre Veränderungen infolge der Stressinduktion können daher nicht ausgeschlossen werden.

5.1.2. Untersuchungen in der DYT1-Maus

5.1.2.1. Genotypisierung

Zuchtpaare transgener DYT1-Mäuse und Kontrolltiere wurden uns freundlicherweise von Dr. Nutan Sharma, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School (Massachusetts, USA) zur Verfügung gestellt. Die Nachzucht dieser Mäuse erfolgte in der institutseigenen gentechnischen Anlage, wobei der genaue genetische Status der Tiere zunächst nicht bekannt war. Da genetische Merkmale oft auf einem autosomal-rezessiven Erbgang basieren, wurde bei allen Nachkommen eine Genotypisierung mittels PCR (Methode s. 3.2.2.1.) durchgeführt. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die in den Versuchen eingesetzten transgenen Mäuse tatsächlich Träger des humanen Defektgens waren. Um eine potentielle Belastung der Tiere durch die Entnahme der Gewebeprobe so weit wie möglich zu vermeiden, wurden nach Grundsätzen des "3R"-Prinzips nach Russel und Burche (1959) (Replacement (Vermeidung), Refinement (Verfeinerung), Reduction (Verringerung)) Kotproben der Mäuse als DNA-Quelle gewählt (Hamann et al., 2010). Nach Aufreinigung der DNA mittels eines DNA Exktraktionskits für Kotproben (Vorgehen s. tabellarischer Anhang) erfolgte die PCR in Anlehnung an die von Sharma und Mitarbeitern (2005) beschriebene Genotypisierung. Bei der PCR-Analyse handelt es sich um ein sehr empfindliches Nachweisverfahren, mit dem durch die schrittweise Amplifikation selbst kleinste Mengen an DNA nachgewiesen werden können. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt jedoch in seiner hohen Anfälligkeit gegenüber Kreuzkontaminationen, sodass während der gesamten Genotypisierung auf ein steriles Arbeiten und eine ununterbrochene Kühlung der Proben geachtet wurde. Um mögliche falsch positive und falsch negative Ergebnisse auszuschließen, wurden bei jedem Ansatz eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die von uns durchgeführte PCR zeichnete sich durch ein deutliches reproduzierbares Signal aus, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die in den Versuchen eingesetzten Tiere das humane Defektgen in sich trugen. Es muss allerdings bedacht werden, dass das Vorliegen des entsprechenden Gens allein nicht ausreichend ist, um Aussagen über die Expression eines von ihm codierten Proteins zu treffen (Schenkel, 2006, Lange, 2009). Demzufolge wäre es sinnvoll gewesen, das zu untersuchende Protein, in diesem Fall TorsinA, zu detektieren. Auf diesen Nachweis wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings verzichtet, da die Expression des mutierten Proteins bereits von der Arbeitsgruppe um Dr. N. Sharma, die uns diese transgene Mauslinie zur Weiterzucht zur Verfügung gestellt hat, mittels Westernblot-Analysen nachgewiesen wurde (Sharma et al., 2005).

5.1.2.2. Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der Vitalität und Motorik von DYT1-Mäusen

In den letzten 10 Jahren wurden verschiedene transgene Mauslinien, in die das humane DYT1-Gen eingebracht wurde, als Tiermodell für die Early-onset-TD generiert, die allerdings alle keine Dystonie-Symptomatik entwickeln. Durch die Verabreichung eines Cholinomimetikums und einer hieraus resultierenden cholinergen Überaktivität sollte in der zugrundeliegenden Arbeit daher geklärt werden, ob dystone Symptome bei den in dieser Arbeit verwendeten DYT1-Mäusen provoziert werden können.

Allgemein sollte bei der Interpretation von Untersuchungen des motorischen Systems berücksichtigt werden, dass der Lokomotion ein komplexes Verhaltensmuster zugrundeliegt, das nicht allein durch die zentrale Modulation innerhalb der Basalganglien, sondern auch von anderen zentralen und peripheren Nervenstrukturen und von der Vitalität der Tiere abhängig ist (Matthews, 2001). Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn bei einem genetisch veränderten Tiermodell, wie beispielsweise der DYT1-Maus, nicht ausgeschlossen werden kann, dass die genetische Manipulation tatsächlich nur auf eine Gehirnstruktur beschränkt bleibt und entsprechende Verhaltenseffekte auf diese spezifische Struktur zurückzuführen sind (Crawley, 2000). Das motorische Verhalten wird darüber hinaus auch vom Stresszustand beeinflusst. Dieser hängt stark von äußeren Einflüssen ab und variiert beispielsweise mit dem Testprotokoll (Testdauer/Dauer Habituation), der Untersuchungsumgebung (Apparatur, Transportstress, Tageszeit) und dem Untersucher selbst (Erfahrung im Umgang mit den Tieren, Eigengeruch), so dass ein hohes Maß an Standardisierung erforderlich ist (Bailey et al., 2006; Crawley, 2000; Richter, 2007). In der zugrundeliegenden Arbeit wurden die Tiere daher stets 1 h vor Versuchsbeginn in die Versuchsräume gebracht, um sie an die dort herrschenden Bedingungen zu adaptieren. Weiterhin wurden Tageszeit, Dauer der Versuche, die Reihenfolge der Tiere in den Verhaltenstests und die Umgebungsbedingungen wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit im Laufe der Versuche konstant gehalten. Da an einem Tier mehrere Tests durchgeführt wurden (s. unten), wurde außerdem darauf geachtet, dass die Experimente immer in derselben Reihenfolge vorgenommen wurden.

Zur Beurteilung der Effekte einer cholinergen Überaktivität auf das Verhalten und die Motorik transgener DYT1-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren wurden eine Reihe etablierter Testverfahren in Anlehnung an Literaturangaben (Crawley, 1999 und 2000; Karl *et al.*, 2003; Dunnett *et al.*, 2003; Lange, 2009) durchgeführt (s. Kap. 3.2.2.2.).

Mit Hilfe des *Activity Cage* war es möglich, die spontane Bewegungsaktivität, die auf dem natürlichen Erkundungsverhalten der Tiere basiert, quantitativ zu beurteilen. Dabei wurden die vertikale und die horizontale lokomotorische Aktivität getrennt voneinander mittels Infrarotsensoren erfasst. Der übersichtliche Versuchsaufbau ermöglichte darüber hinaus,

eventuell auftretende Veränderungen im Bewegungsmuster, Körperfehlstellungen sowie Verhaltensauffälligkeiten zu erkennen. Eine Reduktion der lokomotorischen Aktivität aufgrund einer Habituation an die Versuchsbedingungen, wie sie in anderen Studien beschrieben wurde (Bolivar *et al.*, 2000; Platel und Porsolt, 1982), kann auch in den eigenen Versuchen durch die mehrfache Verwendung der Tiere nicht ausgeschlossen werden und sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Beim akzelerierenden Rotarod handelte es sich um ein geeignetes Testverfahren zur quantitativen Analyse der motorischen Koordinationsfähigkeit und des Gleichgewichts. Der kontinuierliche Geschwindigkeitsanstieg von 4 auf 40 rmp innerhalb eines Zeitintervalls von 5 min gilt hierbei als Standard (Karl et al., 2003). Da aufgrund der ansteigenden Geschwindigkeit eine permanente Adaptation der Bewegung notwendig ist, lieferte dieser Test zusätzlich Aussagen über das motorische Lernverhalten der Tiere (Crawley, 2000). Dieser Parameter ist insofern interessant, als das bei DYT1-Patienten, aber auch DYT1-Genträgern ohne Ausprägung einer dystonen Symptomatik ein verlangsamtes motorischen Lernen nachgewiesen wurde (Ghilardi et al., 2003). Da in der zugrundeliegenden Arbeit der Aspekt der Altersabhängigkeit jedoch nicht Teil der Fragestellung war, wird auf diese Komponente hier nicht näher eingegangen. Entgegen der Empfehlung der Literatur, die Tiere einer Vorab-Trainingsphase von 2-4 Tagen zu unterziehen, wurde der eigentlichen Messung lediglich eine Eingewöhnungszeit von 60 sec vorangestellt. Diese Vorgehensweise basierte auf eigenen Beobachtungen, bei denen die Motivation der Tiere mit der Anzahl der Durchgänge im Laufe des Versuches nachzulassen schien. Ergebnisse vorangehender Studien zur Koordinationsfähigkeit der hier verwendeten DYT1-Mäuse ergaben lediglich bei 9 Monate alten Tieren Defizite in der Rotarod-Performance, nicht jedoch bei jüngeren Tieren (Sharma et al., 2005; Zhao et al., 2008).

Untersuchungen im *Wire-hang Test* und *Grip-strength Test* dienten der Überprüfung der neuromuskulären Kraft, um unspezifische und periphere Effekte der Substanz, die zentral bedingte motorische Defizite maskieren oder verstärken könnten, aufzudecken. Der Wirehang Test war hierbei eine geeignete Methode, um die Muskelkraft der Vorder- und Hinterpfoten der Tiere zu beurteilen. Während dieser Test in einigen Studien für die Bewertung der motorischen Geschicklichkeit und Koordination verwendet wurde (Colotla *et al.*, 1990), diente er in der vorliegenden Arbeit vielmehr zur Bestimmung der Befähigung der Tiere, sich aus eigener Kraft über einen gewissen Zeitraum an einem Gitter festzuhalten. Bei der Durchführung dieses Tests war es wichtig, auf eine korrekte Positionierung des Gitters zu achten. Wurde das Gitter zu dicht über dem Boden gehalten, zeigten die Mäuse eine geringere Motivation sich am Gitter festzuhalten und ließen sich, vergleichbar dem Verhalten im Heimkäfig, in den darunterliegenden leeren Makrolonkäfig fallen, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt hätte. Die Festlegung des Maximalwertes auf 60 sec pro Gitterposition erfolgte anhand von Literaturangaben und wird dort als Standard für diesen Test angegeben (Crawley, 1999; Karl et al., 2003). Um darüber hinaus einen elektronisch messbaren Wert für die neuromuskuläre Kraft der Tiere zu erhalten (Griffstärke in g), wurde zusätzlich der Grip-strength Test durchgeführt. Hierbei wird mit Hilfe eines elektronischen Kraftmessgerätes die Griffstärke der Vordergliedmaßen der Maus gemessen. Da diese Methode ein automatisiertes Verfahren darstellt, wird es von vielen Gutachtern präferiert. Der Nachteil dieses Tests ist aber, dass lediglich die Griffstärke der Vordergliedmaßen ermittelt wird. Zudem besteht die Schwierigkeit für den Experimentator, bei jedem Durchgang das Tier mit einer annähernd gleichbleibenden Fixierung und einer gleichmäßig nach hinten gerichteten Kraft zu bewegen. Eine weitere wichtige Fehlerquelle stellt die Motivation der Tiere zum Umgreifen des Bügels dar, die vermutlich bedingt durch einen Trainingseffekt im Laufe des Versuches deutlich nachließ. Um diese Fehlerquellen zu minimieren, wurden für jede Maus daher fünf aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt, deren Ergebnisse gemittelt wurden. Um die Motivation der Tiere eventuell zu erhöhen, hätte man die Apparatur dicht an der Tischkante montieren können, sodass der Bügel frei in der Luft gehangen und somit für die Maus die einzige Möglichkeit zum Festhalten geboten hätte.

Der Footprint Test stellte eine geeignete Methode dar, um bereits leichte Ganganomalien sowie Anzeichen einer Ataxie anhand des Musters der Fußabdrücke einer Maus zu quantifizieren. Während eine gesunde Maus stets in einer geraden Linie mit regulären, gleichmäßigen Schritten läuft, deuten eine stark variable Schrittlänge und Laufbahn hingegen auf einen ataktischen Gang hin (Barlow et al., 1996). Dieses Testverfahren wurde bereits schon eingesetzt um Ganganomalien durch Schädigung des Striatums (Teunissen et al., 2001), genetische Defekte der Purkinje-Zellen (Jiao et al., 2005), sensorische Neuropathien (Wietholter et al., 1990) sowie diffuse Kleinhirnerkrankungen (McGavern et al., 1999) zu bewerten. So ist es heutzutage möglich, anhand der verschiedenen Gangmuster auf Läsionen spezifischer neuronaler Subsysteme zu schließen (Zhao et al., 2008). Es wurden drei Messungen pro Parameter und Tier vorgenommen und die Ergebnisse anschließend gemittelt. Auf diese Weise war es möglich, die unter normalen Bedingungen auftretenden Variationen in den Parametern zu berücksichtigen. Die ersten und letzten Schritte wurden hierbei wie in der Literatur beschrieben nicht gewertet, da sie durch die Initiierung der Vorwärtsbewegung bzw. einer Verlangsamung der Schrittfolge am Ende des Tunnels andere Gangmuster aufweisen (Karl et al., 2003). Da in einer Studie von Fernagut und Mitarbeitern (2002) aufgezeigt wurde, dass Mäuse bei diesem Test keinen Trainingseffekt aufweisen, wurde auch in der vorliegenden Arbeit auf ein Vorab-Training der Tiere verzichtet und der erste Versuch gewertet, vergleichbar zu vorherigen im Institut durchgeführten Studien (z.B. Lange et al., 2011). Um die Motivation zum Durchqueren des Tunnels zu erhöhen, hätte man am Eingang des Tunnels eine Lichtquelle anbringen und den

Ausgang des Tunnels mit Hilfe eines schutzbietenden Kartons verdunkeln können. Auch die Motivation mittels Futterbelohnung wäre denkbar gewesen. Da die Tiere aber problemlos den Tunnel durchliefen, wurde auf solch ein Vorgehen verzichtet.

Parallel zu den motorischen Tests wurde das *Körpergewicht* der Tiere erfasst und deren *neurologische Reflexe* überprüft, um den allgemeinen Gesundheitszustand zu bestimmen sowie mögliche neurologische Defizite, die einen negativen Einfluss auf die Verhaltensversuche haben könnten, aufzudecken. So kann ein gestörtes Allgemeinbefinden eine gesteigerte Aggression, eine herabgesetzte Aktivität oder eine Überempfindlichkeit gegenüber dem Handling hervorrufen (Karl *et al.*, 2003).

5.1.2.3. Pharmakologische Manipulationen

Bei der hier untersuchten DYT1-Mauslinie deuten Ergebnisse von *in-vitro* Untersuchungen auf Imbalancen zwischen dem cholinergen und dem dopaminergen Neurotransmittersystem hin. So zeigten sich v.a. zahlreiche Hinweise auf Fehlfunktionen des cholinergen Systems im Striatum (Martella *et al.*, 2009; Pisani *et al.*, 2006). Daher wird vermutet, dass eine erhöhte cholinerge Aktivität eine wichtige Rolle bei diesem DYT1-Mausmodell spielen könnte. Um der Bedeutung des cholinergen Systems weiter nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit daher untersucht, ob sich durch das Cholinomimetikum Pilocarpin eine dystone Symptomatik provozieren lässt oder abweichende Effekte im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auftreten.

Hierfür wurde Pilocarpin zunächst akut in Dosierungen von 75 bis 125 mg/kg, die in der Literatur als subkonvulsiv beschrieben wurden (Turski et al., 1984), intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Zur Verminderung von peripheren Effekten wurde Pilocarpin jeweils in Kombination mit 1 mg/kg des peripher wirksamen Antagonisten N-Methyl-Scopolamin i.p. appliziert. Die Durchführung der Versuche erfolgte hierbei im "Cross-over"-Design. Somit stellte jedes Tier seine eigene Vehikelkontrolle dar. Um außerdem eine möglichst objektive Bewertung gewährleisten zu können, handelte es sich um Blindversuche. Dies bedeutet, dass der Untersucher weder wusste, mit welcher Lösung das jeweilige Tier behandelt wurde, noch hatte er Kenntnis zum genetischen Hintergrund der Tiere. Der Beginn der Verhaltenstests nach der Applikation wurde unter Berücksichtigung der pharmakokinetischen Eigenschaften der verwendeten Substanz gewählt. Erste Effekte bei gesunden C57/BI6 Mäusen wurden bereits 5 bis 10 min nach i.p. Applikation von Pilocarpin beschrieben (Turski et al., 1984). In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere mit einer Verzögerung von 15-25 min nach Applikation der Substanz in den Versuchen eingesetzt. Auf diese Weise konnte gewährleistet werden, dass die Substanz ihre volle zentrale Wirkung entfalten konnte, aber auch lange genug anhielt, um alle Verhaltenstests durchzuführen. Um Aussagen über mögliche Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber der Substanz zwischen DYT1-

Mäusen und Wildtyp-Tieren treffen zu können, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein sogenannter Pilocarpin-Score etabliert. der während der pharmakologischen Untersuchungen parallel zu den bereits erläuterten Verhaltens- und Motoriktests erhoben wurde. Die Auswahl der Parameter erfolgte hierbei in Anlehnung an eine frühere Studie von Turski et al. (1984), in der dosisabhängige Effekte des Pilocarpins bei gesunden C57/BI6-Mäusen untersucht und dokumentiert wurden. Neben der Hypolokomotion bzw. Akinesie wurden in der vorliegenden Arbeit ataktische Veränderungen im Gangbild der Tiere sowie das Auftreten von Salivation protokolliert. Da diese Salivation ein eindeutig peripherer Effekt des Pilocarpins ist, können trotz des Einsatzes von N-Methyl-Scopolamin (s. Kap. 3.2.2.3.1.) auch andere periphere Nebenwirkungen der Substanz bei den Mäusen, z.B. auch auf das Herz-Kreislauf-System nicht komplett ausgeschlossen werden. Daher wäre es eventuell sinnvoll, in weiteren Untersuchungen zur Belastungsminimierung eine höhere Dosierung, z.B. 2 mg N-Methyl-Scopolamin zu verwenden bzw. das N-Methyl-Scopolamin, wie auch in anderen Studien beschrieben (z.B. Turski et al., 1984; Gröticke et al., 2007; Müller et al., 2009), bereits 30 min vor Pilocarpingabe zu applizieren. Der in der Literatur im Rahmen eines präkonvulsiven Verhaltens häufig beschriebene Myoklonus der Vorder- und Hinterpfoten konnte in den eigenen Untersuchungen nicht beobachtet werden. Dies zeigt, dass die gewählten Dosierungen keine Konvulsionen provozierten und sich auch nicht im präkonvulsiven Bereich befanden. Allerdings zeigten einige Tiere Unregelmäßigkeiten in der Bewegung bedingt durch eine Muskelsteifigkeit der Gliedmaßen, sodass statt des Myoklonus der Parameter Rigidität in das Score-System aufgenommen wurde. Je nach Schweregrad der Symptome wurden Scores von 0 bis 3, im Falle des Parameters Salivation 0 oder 1 vergeben (s. Kap. 3.2.2.3.1.). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Scores der einzelnen Parameter, die während eines Versuchsdurchlaufs für das Tier ermittelt wurden, anschließend zusammengefasst und als individueller Maximalscore dargestellt. Eine bessere Aussagekraft bezüglich der substanzbedingten Nebenwirkungen hätte sicherlich durch eine differenziertere Auswertung der einzelnen Parameter einschließlich Auftreten und Dauer der jeweiligen Symptome erzielt werden können. Da jedoch lediglich die Frage nach möglichen Abweichungen in der Empfindlichkeit der DYT1-Mäuse gegenüber Pilocarpin im Vergleich zu Wildtyp-Tieren Bestandteil dieser Arbeit war, wurde von einer detaillierteren Darstellung abgesehen. Allgemein gelten Score-Systeme als geeignetes Mittel zur Beurteilung und besseren Charakterisierung von Tiermodellen. Allerdings bergen sie die Gefahr von Fehlinterpretationen durch die subjektive Beurteilung des Experimentators, weshalb darauf geachtet wurde, dass stets der gleiche Untersucher die Beurteilung in den einzelnen Verhaltenstests vornahm.

Nach akuter Gabe des Pilocarpins sollte geklärt werden, ob mit längerfristigen Manipulationen Dystonie-ähnliche Symptome bei DYT1-Mäusen hervorgerufen werden können. Diese Vermutung gründet auf der Beobachtung, dass Effekte einer anticholinergen Therapie bei Dystoniepatienten erst nach längerer Zeit sichtbar sind (Jankovic, 2006), was darauf hindeutet, dass erst langfristige Manipulationen zu entscheidenden Veränderungen des cholinergen Systems führen. Die Behandlungsdauer von 21 Tagen wurde analog zum chronischen Versuch beim dtsz-Hamster gewählt. Die Dosisauswahl (100 mg/kg Pilocarpin + 1 mg/kg N-Methyl-Scopolamin) basierte auf den Ergebnissen des akuten Versuches, bei denen diese Dosis im Gegensatz zu 125 mg/kg weniger stark ausgeprägte substanzbedingte Nebenwirkungen hatte und die Gefahr der Entwicklung von Konvulsionen aufgrund des kumulativen Effekts im Rahmen einer Langzeitbehandlung geringer eingeschätzt wurde. Im Gegensatz zur einmaligen systemischen Pilocarpin-Behandlung wurde auf das Mitführen einer separaten Vehikelkontrollgruppe verzichtet. Stattdessen wurden die Tiere an Tag 1 der 21tägigen Behandlung noch vor der eigentlichen Substanzgabe in den zuvor beschriebenen Verhaltens- und Motoriktests untersucht. An Tag 7, 14 und 21 der 21tägigen Pilocarpin-Behandlung wurden die genannten Tests dann nach Applikation der Testsubstanz wiederholt und die ermittelten Daten mit denen vor den Substanzapplikationen erfolgten Vehikelkontrolle an Tag 1 verglichen. Somit stellte jedes Tier seine eigene Kontrolle dar. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da das Augenmerk dieser Untersuchungen hauptsächlich auf dem direkten Vergleich zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen sowie der Detektion möglicher Unterschiede in deren Empfindlichkeit gegenüber dem Pilocarpin lag. Außerdem konnte auf diese Weise eine Verringerung der Tierzahl im Sinne des Tierschutzes erreicht werden.

Da durch die oben genannten akuten und chronischen systemischen Applikationen des Cholinomimetikums Pilocarpin keine signifikanten Unterschiede zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen auftraten, sollte abschließend geklärt werden, ob durch eine direkte Manipulation von mAChR im Striatum dystone Bewegungsstörungen provoziert werden könnten, da vorangehende *in-vitro* Untersuchungen Fehlfunktionen in dieser Gehirnregion bei den DYT1-Mäusen aufzeigten (Martella *et al.*, 2009; Pisani *et al.*, 2006).

Auf zahlreiche Aspekte zur Mikroinjektionstechnik wurde bereits unter Punkt 5.1.1.3. eingegangen. Die Koordinaten für die chronische Implantation der Führungskanülen bei der Maus wurden in Anlehnung an eine frühere im hiesigen Institut durchgeführte Studie (Richter *et al.*, 2008) gewählt und im Rahmen eigener Vorversuche unter Zuhilfenahme des stereotaktischen Atlas für das Mäusegehirn (Paxinos und Watson, 2001) angepasst. Bei den 20 für die intrastriatalen Mikroinjektionen verwendeten Mäusen waren im Rahmen der histologischen Überprüfung keine fehlerhaften Lokalisationen oder Entzündungssymptome nachweisbar, sodass alle Tiere in die Auswertung einbezogen wurden. Für die striatale Mikroinjektion bei der DYT1-Maus wurde ebenfalls ein Injektionsvolumen von 0,5 µl gewählt, weshalb aufgrund der anatomischen Gegebenheiten von einer Manipulation des gesamten Striatums ausgegangen werden muss. Da bei diesen Untersuchungen jedoch die Frage nach einer möglichen Provokation dystoner Bewegungsstörungen im Vordergrund stand, galt das Hauptaugenmerk der Stimulation des gesamten Striatums und weniger der der einzelnen Subregionen. Zudem lieferten die oben genannten *in-vitro* Untersuchungen der hier verwendeten DYT1-Mauslinie Hinweise auf Fehlfunktionen des cholinergen Systems im gesamten Striatum der Tiere (Martella *et al.*, 2009; Pisani *et al.*, 2006), im Gegensatz zu den Hamstern, bei denen Veränderungen vorwiegend im dorsomedialen Striatum nachgewiesen wurden (Richter, 2005).

Aus Gründen des Tierschutzes wurden auch hier Mäuse für mehrere Dosierungen verwendet, was aufgrund der langen Rekonvaleszenzzeit von bis zu zwei Wochen als unproblematisch erschien. Auch die technischen Materialien und v.a. der Paladur-Aufbau blieben stabil und hielten entgegen der Beobachtungen früherer Studien bei Mäusen (Richter, 2007) einer mehrfachen Verwendung Stand.

Im Gegensatz zu den systemischen Versuchen im DYT1-Mausmodell wurde bei den intrastriatalen Applikationen auf eine zusätzliche Gabe von N-Methyl-Scopolamin verzichtet, da die Testsubstanz Pilocarpin direkt ins Gehirn verabreicht wurde und daher keine starken peripheren Wirkungen zu erwarten waren. Die bilaterale intrastriatale Applikation von Pilocarpin (50 µg/0,5 µl/Hem.) führte bei einigen Wildtyp-Tieren wider Erwarten mindestens zu einem fokalen bis hin zu einem epileptischen Anfall, welcher sich initial durch das Auftreten von Akinesie, Tremor, Ataxie sowie gustatorischen Automatismen mit Salivation äußerten. Dieses präkonvulsive Verhalten steigerte sich im weiteren Verlauf zu starken motorisch limbischen Anfällen, einschließlich eines Vorderextremitätenmyoklonus, dem Aufrichten und teilweise Umfallen der Tiere. Auch stereotype Verhaltensweisen wie Putzen, wiederholtes Kopfzucken sowie plötzliches Hochspringen wurden beobachtet, was Beschreibungen von epileptischen Anfällen bei Mäusen nach Pilocarpingabe in der Literatur (Turski et al., 1984) entspricht. Aufgrund dieser starken Beeinträchtigungen der betroffenen Tiere, konnte ein Großteil der Verhaltenstests nicht durchgeführt werden, sodass sich die Untersuchungen bei diesen Tieren lediglich auf Beobachtungen im Activity Cage beschränkten. Darüber hinaus mussten zwei Tiere (eine DYT1- und ein Wildtyp-Maus) aufgrund eines Status epilepticus euthanasiert werden. Die im Anschluss an eine zweiwöchige Rekonvaleszenzzeit bei denselben Mäusen erneut durchgeführte lokale Manipulation mit Pilocarpin, allerdings in einer niedrigeren Konzentration von 25 µg/0,5 µl/Hemisphäre, führte ebenfalls zur Induktion epileptischer Anfälle. Unerwartet waren im Vergleich zur höheren Dosierung trotz der zweiwöchigen Erholungsphase sogar noch mehr Tiere, diesmal insbesondere DYT1-Mäuse, betroffen, sodass keine statistisch auswertbare

152

Gruppengröße nach Applikation von 25 µg/0,5 µl/Hem. erreicht werden konnte. Daher waren lediglich Aussagen zu Effekten nach intrastriatalen Mikroinjektion von 50 µg/0,5 µl/Hemisphäre Pilocarpin auf das Verhalten und die Motorik transgener DYT1-Mäuse und Wildtyp-Tiere möglich. Allerdings war auch hier die Gruppengröße reduziert bzw. das Verhältnis von DYT1- zu Wildtyp-Mäusen unausgewogen, was für die Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte.

5.1.2.4. Immunhistochemische Untersuchung striataler cholinerger Interneurone bei DYT1-Mäusen

Um mögliche Auswirkungen des Gendefekts auf das cholinerge System im Sinne von Veränderungen in der Verteilung oder der Anzahl striataler cholinerger Interneurone bei der DYT1-Maus näher zu beleuchten, wurde in der vorliegenden Arbeit die striatale Dichte dieses Nervenzelltyps untersucht. Die Methode zur immunhistochemischen Markierung der striatalen cholinergen Interneurone erfolgte dabei in Anlehnung an eine vorangegangene Studie bei dt^{sz}-Hamstern (Hamann et al., 2006) und erwies sich auch in den eigenen Untersuchungen als geeignet. Cholinerge Interneurone zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Acetylcholin sowie dem für dessen Biosynthese erforderlichen Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) aus. Andere Neurone des Striatums wie beispielsweise Projektionsneurone exprimieren hingegen kein ChAT, was eine eindeutige Unterscheidung von anderen Neuronentypen ermöglicht (Eckenstein und Thoenen, 1982). Während in früheren Studien hauptsächlich die Acetylcholinesterase als immunhistochemischer Marker zur Identifizierung cholinerger Interneurone eingesetzt wurde, wird heutzutage von dessen Verwendung abgesehen, da nachgewiesen wurde, dass dieses Enzym nicht wie angenommen nur von cholinergen, sondern auch von somatostatinhaltigen Interneuronen exprimiert wird (Sirviö und Riekkinen, 1992). Die ChAT hingegen gilt als verlässlicher Marker, da sie lediglich cholinerge Zellen anfärbt, weshalb sie auch in dieser Arbeit zur Markierung cholinerger Interneurone verwendet wurde. Die in den eigenen Untersuchungen markierten Zellen stimmten sowohl in der Verteilung als auch in der Morphologie mit früheren Beschreibungen von ChAT⁺-Interneuronen bei Nagern überein (Kawaguchi et al., 1997; Hamann et al., 2006). Auch der in der Literatur beschriebene (Hamann et al., 2006; Schlösser et al., 1999; van Vulpen und van der Kooy, 1998) anterior-posteriore, dorsoventrale sowie medio-laterale Gradient in der Verteilung cholinerger Interneurone im Striatum von Nagetieren war deutlich zu erkennen. Für die Quantifizierung der markierten Interneurone wurde aus beiden Gehirnhälften jeden Schnittes ein mittiger Bildausschnitt pro Subregion mit Hilfe eines Bildanalysesystems ausgezählt. Hierdurch konnte die Dichte der ChAT⁺-Interneurone mittels einer Formel auf Basis der gemessenen Fläche der ausgezählten Regionen sowie der bekannten Schnittdicke errechnet werden. Mit diesem

Vorgehen wird eine im Vergleich zu absoluten Zahlen größere Aussagekraft erreicht, da eventuelle Unterschiede bezüglich der Gehirnvolumina, die in dieser Studie allerdings nicht ermittelt wurden, auf diese Weise relativiert werden (Hamann, 2000). Durch die Verschlüsselung der Objektträger sowie die hohe Anzahl ausgezählter Schnitte kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Ergebnissen dieser Arbeit um eine zufällige und repräsentative Ermittlung der Interneuronendichte handelt.

5.1.2.5. Westernblot-Analyse der Cholinacetyltranferase

Die Westernblot-Analyse wurde als zusätzliches Verfahren zum Nachweis der Expression der ChAT durchgeführt, um Aufschluss über mögliche Veränderungen auch innerhalb anderer Gehirnstrukturen treffen zu können. Hierfür wurden neben dem Striatum auch Kortex, Cerebellum und Hirnstamm in die Untersuchungen einbezogen. Der Westernblot ist ein Verfahren mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten, das neben der Detektion und Quantifizierung auch Aussagen zur Größe des Proteins sowie einen Vergleich des Proteingehalts verschiedener Proben erlaubt (z.B. Towbin et al., 1979; Dennis-Sykes et al., 1985). Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode ist hingegen, dass sie zeitaufwendig ist und einer teilweise langwierigen Optimierung der Versuchsbedingungen bedarf. Auch in den eigenen Untersuchungen war eine Reihe von Vorversuchen erforderlich, um reproduzierbare hervorzubringen. und robuste Ergebnissen Diese erstreckten sich von Titrationsexperimenten zur Bestimmung einer adäguaten Antikörper (Ak)-Konzentration bis hin zur Findung einer optimalen Expositionsdauer der Röntgenfilme. Die Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der verschiedenen Bahnen des Gels erfolgte mittels einer Ladekontrolle. Dabei war es wichtig, ein Protein zu wählen, das ein anderes Molekulargewicht besitzt, als das des zu untersuchenden Proteins. Dadurch wird gewährleistet, dass die Banden der Ladekontrolle leicht von den anderen Proteinen unterschieden werden können. Daher wurde in der zugrundeliegenden Arbeit β-Actin als Ladekontrolle verwendet, da es mit einer Bande in Höhe von 45 kDa mit keiner der anderen Banden zusammenfiel, wie es bei anderen häufig verwendeten Ladekontrollproteinen wie GAPDH (30-40 kDa) oder Tubulin (55 kDa) der Fall wäre. Entgegen einer Studie von Dittmer und Dittmer (2006), in der die Eignung des β -Actins als Ladekontrolle aufgrund seiner weiten Verbreitung und der nach Meinung der Autoren damit einhergehenden geringeren Sensitivität zur Detektion von Beladungsunterschieden in Frage gestellt wird, erwies sich das Protein in den eigenen Untersuchungen aufgrund des starken und reproduzierbaren Signals als geeignet. Im Hinblick auf die Ergebnisse des Westernblots hätte eine präzisere Auswertung der Proteinbanden eventuell mit Hilfe einer Grauwertanalyse, z.B. mit dem Computerprogramm Image J, erreicht werden können. Auch eine im Voraus durchgeführte Proteinreinigung wäre durchaus denkbar gewesen, um eine bessere Auftrennung der Banden zu erzielen. Da die Westernblot-Analyse in der zugrundeliegenden Arbeit jedoch lediglich als additives Verfahren zu den immunhistochemischen Untersuchungen diente, wurde auf eine weitere Analyse der Ergebnisse verzichtet.

Wie in Kap. 4.2.4. dargestellt, ergab der Westernblot für alle vier untersuchten Gehirnregionen reproduzierbare ChAT-immunreaktive Banden. Neben einer Bande in Höhe von 71 kDa, die dem errechneten Molekulargewicht des Proteins entspricht, wurde eine Bande in Höhe von 68 kDa detektiert. ChAT Proteine, die aus neuronalem Gewebe verschiedener Tierarten aufgereinigt wurden, weisen ein Molekulargewicht zwischen 67 und 68 kDa auf (Oda, 1999), was mit der in den eigenen Untersuchungen detektierten Bande übereinstimmt. Darüber hinaus wurden weitere drei Banden mit einem niedrigeren Molekulargewicht ermittelt, die zwar in der Literatur beschrieben werden, jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um eventuelle Kreuzreaktionen des eingesetzten Ak mit dem Gewebe handelt, wurde die Aminosäuresequenz des Anti-ChAT Ak für die Maus mittels des sog. Blast (Abk. für engl. Basic Local Alignment Search Tool) Search Verfahrens mit bereits vorhandenen Seguenzen einer Datenbank verglichen. Hierbei lieferte das Programm ein Alignement, also eine Übereinstimmung in der Gegenüberstellung eines Stückes der untersuchten Seguenz mit ähnlichen Stücken aus der Datenbank. Diese Aminosäuresequenz codiert laut Datenbank einen für die Maus relevanten Kalium-Kanal im Gehirn (Kv-Kanal) mit einem Molekulargewicht von etwa 56 kDa. Auch in den eigenen Untersuchungen wurde eine Bande in Höhe von 56 kDa detektiert, auf deren Bedeutung später genauer eingegangen wird. Da ansonsten keine weiteren Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz des ChAT-Ak gefunden wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den übrigen detektierten Banden höchstwahrscheinlich um Degradationsprodukte von ChAT handelte. Abbauprodukte können z.B. infolge translationaler Modifikation aufgrund der proteolytischen Prozessierung am Aminoterminus oder durch Proteolyse während der Enzymreinigung entstehen (Oda, 1999). Um eine eindeutige Aussage zu den einzelnen Banden treffen zu können, wären massenspektrometrische Analysen des Proteins in Betracht zu ziehen.

5.2. Ergebnisse

5.2.1. dtsz-Hamster

- 5.2.1.1. Pharmakologische Manipulation von mAChR im dtsz-Hamster
- 5.2.1.1.1. Einmalige systemische Applikation der mAChR-Antagonisten Tropicamid und Trihexyphenidyl

Durch die geringen Kenntnisse über die Pathophysiologie sind die Erfolge der zurzeit rein empirisch durchgeführten Therapiemaßnahmen häufig enttäuschend, sodass Dystonien oft in schweren Behinderungen münden. Anticholinergika, die vornehmlich den mAChR vom Subtyp 1 blockieren, wie Trihexyphenidyl, Biperiden, Benztropin und Ethopropazin, bewirken zwar eine Besserung bei einigen Dystoniepatienten, aufgrund der weiten Verteilung von M1-Rezeptoren im ZNS aber auch im peripheren Gewebe ist deren Einsatz häufig mit einer Vielzahl von schwerwiegenden Nebenwirkungen behaftet (Jankovic, 2006). Im Fokus derzeitiger Diskussion steht eine mögliche pathophysiologische Beteiligung des striatalen M4-Rezeptors an Basalganglien-Erkrankungen (Pisani et al., 2006), der somit ein interessantes therapeutisches Target für die Behandlung von Dystonien darstellen könnte. Darüber hinaus ist die Verteilung des M4-Rezeptors in der Peripherie hauptsächlich auf das Lungengewebe beschränkt (Dörje et al., 1991), weshalb M4-Rezeptor-Antagonisten im Vergleich zu bisherigen Anticholinergika einen entscheidenden Vorteil bezüglich des Auftretens von Nebenwirkungen für die Dystonie-Therapie bieten könnten. Bislang herrscht jedoch ein Mangel an hochselektiven M4-Rezeptoren-Antagonisten, die in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (Brady et al., 2008). Erste Ergebnisse einer Studie zur pathophysiologischen Bedeutung des mAChR vom Subtyp 4 mittels einer akut systemischen Verabreichung des relativ selektiven M4-Antagonisten Tropicamid ergaben keine signifikanten Effekte auf den Schweregrad der Dystonie beim dt^{sz}-Hamster. Allerdings zeigte sich nach Applikation der höchsten Dosierung von 60 mg/kg eine deutliche Verzögerung der Latenz bis zum Eintreten einer paroxysmalen dystonen Episode (Smiljanic, 2010). Dieser moderate antidystone Effekt ist mit Beobachtungen früherer Studien zu antidystonen Wirkungen von M1-Rezeptor-Antagonisten im dt^{sz}-Hamster wie Trihexyphenidyl vereinbar, in denen die akute Behandlung zwar keine Abschwächung der dystonen Schweregrade, aber eine Verzögerung der Latency on zur Folge hatte (Löscher und Fredow, 1992). Im vorliegenden Promotionsverfahren sollte daher untersucht werden, ob durch die Kombination von M1- und M4-Rezeptor-Antagonisten ein synergistischer Effekt bei geringerer Inzidenz von Nebenwirkungen erzielt werden kann.

Die Ergebnisse der akut systemischen Applikation haben gezeigt, dass sich die Arbeitshypothese teilweise bestätigt und die kombinierte Verabreichung einen stärkeren antidystonen Effekt aufweist als die alleinige Verabreichung der beiden Substanzen. Während nach Applikation der niedrigsten Dosierung (15 mg/kg + 10 mg/kg) lediglich eine Tendenz zur Verbesserung der dystonen Bewegungsstörungen zu verzeichnen war, konnten mit der mittleren Dosierung (30 mg/kg + 15 mg/kg) signifikante antidystone Effekte beim *dt^{sz}*-Hamster erzielt werden, die sich sowohl in einer Reduktion der Dystonie-Schweregrade (zweite und dritte Beobachtungsstunde) als auch einer deutlichen Verzögerung der Latency on bis zum Einsetzen erster dystoner Symptome äußerte. Durch eine weitere Erhöhung der Dosis (60 mg/kg + 30 mg/kg) konnten unerwarteterweise keine antidystonen Effekte in Bezug auf die Dystonie-Schweregrade ausgelöst werden, doch war die Latency on auch hier signifikant verlängert. Die möglichen zugrundeliegenden Mechanismen der hier gesehenen synergistischen Effekte von 30 mg/kg Tropicamid + 15 mg/kg Trihexyphenidyl sowie die unerwarteterweise ausbleibenden antidystonen Effekte nach Applikation der hohen Dosis werden im Folgenden näher erläutert.

Trotz der breiten Verteilung von M1- und M4-Rezeptoren im ZNS, könnte ihre Funktion innerhalb des Striatums bzgl. der pharmakologischen Effekte im *dt*^{sz}-Hamster von Bedeutung sein, da bei diesem Tiermodell striatale Fehlfunktionen mehrfach nachgewiesen wurden. Wie bereits in Kap. 2.2.3.2. beschrieben, aktivieren M1-Rezeptoren über Gq die Phospholipase C, die wiederum zu einer IP₃-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER sowie einer DAGvermittelten Aktivierung der Proteinkinase C führt. M4-Rezeptoren hingegen inhibieren über Gi-Proteine die Adenylatcyclase und aktivieren G-Protein-gekoppelte K⁺-Kanäle, woraus eine Hyperpolarisation resultiert (Caulfield, 1993). Innerhalb des Striatum sind M1-Rezeptoren vornehmlich auf GABAergen Projektionsneuronen lokalisiert. Agonisten am M1-Rezeptor sind in der Lage, die GABAergen Projektionsneuronen zu depolarisieren, indem sie den ausgehenden K⁺-Strom reduzieren und gleichzeitig den eingehenden Ca²⁺-Strom inhibieren. Darüber hinaus werden glutamaterge Efferenzen aus dem Kortex und dem Thalamus durch postsynaptische M1-Rezeptoren positiv moduliert, was ebenfalls in einer Depolarisation der GABAergen Projektionsneurone resultiert (zur Übersicht s. Pisani et al., 2007). Dies kann durch den M1-Antagonisten Trihexyphenidyl blockiert werden und folglich zu einer Reduktion der Aktivität GABAerger Projektionsneurone führen. Da eine erhöhte Aktivität striataler GABAerger Projektionsneurone im dt^{sz}-Hamstermodell beobachtet wurde (Gernert et al., 1999a; Hamann et al., 2009), kann angenommen werden, dass Trihexyphenidyl zwar eine Reduktion der Aktivität GABAerger Projektionsneurone bewirkte, diese Reduktion allein jedoch nur zu einer verzögerten Latency on, nicht aber zu einer signifikanten Reduktion der Schweregrade der Dystonie geführt hat.

In einer Studie von Koos und Tepper (2002) konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation postsynaptischer M4-Rezeptoren auf striatalen PV⁺-reaktiven Interneuronen die GABA-Freisetzung innerhalb des Striatums gehemmt wird. Da ein Defizit an striatalen PV⁺reaktiven Interneuronen beim dtsz-Hamster vermutlich über eine verminderte GABAerge Inhibition innerhalb des Striatums zur erhöhten Aktivität GABAerger Projektionsneurone erheblich beisteuert (Gernert et al., 2000), wurde eine Verbesserung der Dystonie im dtsz-Hamstermodell durch die Behandlung mit dem M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid erwartet. Auch hier zeigte sich jedoch, dass die alleinige Gabe von Tropicamid nur zu einer Verlängerung der Latency on, nicht aber zur Reduktion der Dystonieschwere führte (Smiljanic, 2010). Trotzdem wäre es möglich, dass der oben beschriebene Effekt des Tropicamids an PV⁺-reaktiven Interneuronen in Kombination mit den durch den M1-Antagonisten Trihexyphenidyl vermittelten Effekten an GABAergen Projektionsneuronen zu einer Normalisierung des neuronalen Netzwerkes geführt hat, was die in den eigenen Versuchen beobachtete antidystone Wirkung nach kombinierter Gabe der mittleren Dosierung (30 mg/kg + 15 mg/kg) erklären könnte. Neben den Effekten auf das glutamaterge und GABAerge System ist zudem bekannt, dass ACh auch mit dem dopaminergen System innerhalb der Basalganglien eng interagiert. So kann die Aktivierung von M4-Rezeptoren, die auf nigrostriatalen dopaminergen Neuronen lokalisiert sind, in einer reduzierten Dopaminausschüttung resultieren (Pisani et al., 2007; Wess et al., 2007). Es ist daher anzunehmen, dass eine durch Tropicamid herbeigeführte Blockade der M4-Rezeptoren eine Steigerung der Dopamin-Freisetzung hervorruft, was aufgrund früherer Studien, die eine erhöhte dopaminerge Aktivität im Striatum dystoner Hamster zeigten (Hamann und Richter, 2004; Rehders et al., 2000), eher prodystone Effekte nach sich ziehen dürfte. Über die zusätzliche Funktion der M4-Rezeptoren im Sinne eines präsynaptischen Autorezeptors wäre es außerdem denkbar, dass die Blockade dieses Rezeptortyps zu einer gesteigerten ACh-Freisetzung und somit zu einer Verdrängung des Trihexyphenidyls und Tropicamids von der Rezeptorbindungsstelle führt und dadurch die durch die jeweilige Substanz bewirkten Effekte abschwächt. Dieser Mechanismus würde auch eine plausible Erklärung für das Ausbleiben antidystoner Effekte nach kombinierter Verabreichung der höchsten Dosis (60 mg/kg +30 mg/kg) liefern.

5.2.1.1.2. Systemische Applikationen von mAChR-Antagonisten über einen Zeitraum von 21 Tagen

Es ist bekannt, dass Anticholinergika bei Dystoniepatienten zwar bereits nach kurzer Zeit einen gewissen antidystonen Effekt aufweisen können, in der Regel aber erst nach einer längeren Behandlungsdauer von mehreren Wochen bis hin zu Monaten ihre volle Effektivität entfalten (Jankovic, 2006). Daher sollte in den hier durchgeführten Untersuchungen mittels einer täglichen Applikation über einen Zeitraum von 21 Tagen geklärt werden, ob sich durch die langfristige Manipulation von mAChR mit Trihexyphenidyl allein bzw. in einer Kombination mit dem M4-Antagonisten Tropicamid eine Steigerung der nach einmaliger Gabe moderat ausgeprägten antidystonen Wirksamkeit bei den *dt*^{sz}-Hamstern erzielen lässt und eine mögliche Toleranzentwicklung bei Nebenwirkungen vorhanden ist. Vorangegangene Studien zur langfristigen Manipulation mit dem M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid allein zeigten nur moderate antidystone Effekte im Sinne einer verzögerten Latenzzeit, vergleichbar den akuten Applikationen (Smiljanic, 2010).

Eigene Untersuchungen mit Trihexyphenidyl über einen Zeitraum von 21 Tagen hatten hingegen weder Effekte auf die Dystonieschwere noch auf die Latency on beim *dt^{sz}*-Hamster zur Folge. Allerdings fiel auf, dass während der gesamten Versuchsdauer von 59 Tagen die Tiere nur mäßig ausgeprägte Dystonie-Schweregrade entwickelten, was für die Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte.

Mit der kombinierten Verabreichung von Tropicamid und Trihexyphenidyl war es ebenfalls nicht gelungen, die während des dreistündigen Beobachtungszeitraumes maximal erreichten Schweregrade dystoner Episoden bei den *dt^{sz}*-Hamstern im Vergleich zur Vehikelbehandlung zu reduzieren, jedoch konnte eine partielle Abnahme der Dystonie-Schweregrade während der ersten Beobachtungsstunde verzeichnet werden. Hierbei zeigten substanzbehandelte Tiere an ihrem 27., 29., 32. und 41. LT niedrigere Dystonie-Scores als die vehikelbehandelten Tiere. Darüber hinaus wurden in der Zeitspanne vom 22. bis zum 31. LT niedrigere AUC bei substanzbehandelten *dt^{sz}*-Hamstern im Vergleich zu vehikelbehandelten Tieren ermittelt und somit ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen bestätigt. Eine erhoffte Potenzierung der antidystonen Wirksamkeit durch eine längerfristige Manipulation im Vergleich zur einmaligen systemische Gabe der mAChR-Antagonisten konnte jedoch nicht erreicht werden. Interessanterweise wiesen die im Rahmen der Langzeitbehandlungen verwendeten Tiere eine deutlich verzögerte Spontanremission auf, so dass der in früheren Studien beobachtete altersabhängige Dystonieverlauf (Richter und Löscher, 1998), bei dem die Symptome der Dystonie ab etwa dem 42. LT nachließen und etwa ab dem 70. LT nicht mehr durch Stress induzierbar waren, in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Da sowohl substanz- als auch vehikelbehandelte Tiere gleichermaßen diesen abweichenden Dystonie-Verlauf zeigten, könnte vermutet werden, dass der durch die tägliche Injektion bedingte Stress in der Phase erhöhter Suszeptibilität eine größere Rolle für die Manifestation der Dystonie zu spielen scheint als die applizierte Substanz an sich. Diese Beobachtung steht mit vorhergehenden Studien im Einklang (Hamann et al., 2008, Smiljanic, 2010). Die neuronale Verschaltung der Stress-Kaskade besteht aus einem komplexen Netzwerk, in das unter anderem die dorsalen Raphe-Kerne involviert sind, die wiederum starken Einflüssen durch das Stresshormon Kortisol unterliegen

(Lechin et al., 2006). Basierend auf einer vorangegangenen Studie ist zudem bekannt, dass durch Stressinduktion erhebliche Veränderungen in der lateralen Habenula beim dtsz-Hamster hervorgerufen werden können (Richter und Löscher, 1998), einer Gehirnstruktur, die Afferenzen aus dem Nucleus entopeduncularis erhält und zu den dorsalen Raphe-Kernen projiziert. Die dorsalen Raphe-Kerne stellen weiterhin eine wichtige Quelle serotonerger Projektionen zum Striatum dar. Der chronische Injektionsstress und der damit vermutlich erhöhte Kortisol-Spiegel könnten die Effekte der lateralen Habenula auf die dorsalen Raphe-Kerne möglicherweise potenzieren. Dies führt zu der Annahme, dass eine langfristige Überaktivität der serotonergen Projektionen zum Striatum die bereits bestehenden Dysfunktionen des kortiko-striato-thalamo-kortikalen Netzwerkes verstärkt. Bestätigung findet diese Hypothese in vorangehenden Studien, bei denen die pharmakologische Aktivierung des serotonergen Systems eine Verschlimmerung der Dystonie bei der dt^{sz} -Hamstermutante hervorrief (Richter und Löscher, 1995). Des Weiteren ist bekannt, dass der Einfluss von Kortikosteron zu Abweichungen in der Langzeit-Potenzierung bei Ratten führt (Pavlides et al., 1995; Xu et al., 1997). Daher kann vermutet werden, dass stresshormoninduzierte Veränderungen der LTP durch die chronische Behandlung über einen Zeitraum von 21 Tagen die bereits vorliegenden Störungen der LTP bei der Hamstermutante (Köhling et al., 2004) intensivieren kann. Aufgrund dessen kann also nicht ausgeschlossen werden, dass der durch den Stress verursachte, vermutlich starke Effekt Einfluss auf die hier durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen hatte und somit möglicherweise die genaue Wirkung der untersuchten Substanzen überdeckte.

Ein weiterer Grund für das Ausbleiben antidystoner Effekte könnte eine Herabregulierung von mAChR infolge der chronischen Applikation darstellen, was durch die allmähliche Reduktion zentraler Nebenwirkungen während der Behandlungsphase angedeutet wird. Die hier diskutierten Hypothesen sind jedoch bislang rein spekulativ und sollten daher durch weiterführende Untersuchungen wie beispielsweise eine direkte Applikation von Stresshormonen, z.B. Glukokortikoide, belegt werden.

5.2.1.1.3. Striatale Mikroinjektionen von mAChR-Antagonisten

Die striatalen Mikroinjektionen sollten Aufschluss darüber geben, inwiefern striatale mAChR an den nach akuter und chronisch systemischer Gabe beobachteten moderaten Effekten anticholinerger Substanzen auf deren Wirkung im Striatum beruhen. Die lokale striatale Manipulation von M4-Rezeptoren mittels Mikroinjektion von Tropicamid im Rahmen vorangegangener Untersuchungen führte nicht zur Reduktion der Dystonieschwere, zeigte aber eine Tendenz zur Verlängerung der Latenzzeit (Smiljanic, 2010). Um der pathophysiologischen Rolle striataler mAChR am Dystoniegeschehen weiter nachzugehen, wurden daher intrastriatale Mikroinjektionen des M1-Rezeptor-Antagonisten Trihexyphenidyl allein sowie in Kombination mit dem M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid durchgeführt.

Wie in Kap. 4.1.1.3.1. aufgezeigt, bewirkte keine der intrastriatal applizierten Dosierungen (200-800 ng/0,5 µl/Hem.) des M1-Antagonisten Trihexyphenidyl allein eine signifikante Reduktion des Schweregrades dystoner Bewegungsstörungen beim *dt^{sz}*-Hamster, was mit den Ergebnissen der akuten sowie chronischen systemischen Applikationen vergleichbar war. Auch die Latenzzeit bis zum Einsetzen erster eindeutiger dystoner Symptome blieb nach intrastriataler Gabe, ähnlich wie zuvor für die chronisch systemische Behandlung mit Trihexyphenidyl beschrieben, unverändert.

Aufgrund der nach kombinierter systemischer Verabreichung von Trihexyphenidyl und Tropicamid aufgetretenen moderaten Effekte auf das Dystoniegeschehen beim *dt^{sz}*-Hamster wurde auch für die intrastriatale Applikation der beiden mAChR-Antagonisten eine antidystone Wirkung erwartet. Die mittels Mikroinjektionen durchgeführte Manipulation striataler M1- und M4-Rezeptoren führte jedoch weder zu einer Reduktion der Dystonieschwere noch hatte sie Einfluss auf die Latency on.

Die Tatsache, dass nach intrastriataler Mikroinjektion von mAChR-Antagonisten keine signifikanten Effekte festzustellen waren, lässt die Beteiligung extrastriatale Gehirnregionen vermuten. Obwohl Tropicamid als selektiver M4-Antagonist angesehen wird, ist auch seine Selektivität gegenüber dem M4-Rezeptor nur begrenzt (Ukai *et al.*, 2004; Betz *et al.*, 2007). Daher kann durch die hier vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass M4-Antagonisten mit höherer Selektivität, die jedoch bislang nicht erhältlich sind, einen stärkeren Effekt hervorrufen könnten.

Technische Fehler in der Durchführung der striatalen Mikroinjektion sind nicht als Grund für das Ausbleiben dystoner Symptome anzunehmen, da diese Methode am hiesigen Institut gut etabliert ist und bereits im Rahmen früherer Studien deutliche dosisabhängige Effekte nach Anwendung dieser Applikationsmethode nachgewiesen wurden wie z.B. für die Verabreichung GABAerger sowie antidopaminerger Substanzen belegt (Gernert *et al.*, 2000; Hamann und Richter, 2002; Rehders *et al.*, 2000). Die große Diskrepanz zwischen den Effekten, wie sie in früheren Studien nach striataler Applikation von GABAmimetischen Substanzen bzw. dopaminergen Antagonisten beschrieben wurden und den hier dargestellten Ergebnissen infolge striataler Manipulation mittels anticholinerger Substanzen, lässt darauf schließen, dass Dysfunktionen der GABAergen und dopaminergen Neurotransmission im Striatum dystoner Hamster eine wichtigere Rolle für die Manifestation der Dystonie spielen als diejenigen der cholinergen Neurotransmission.

5.2.1.1.4. Striatale Mikroinjektionen des positiven allosterischen Modulators VU0152100

Wie bereits erwähnt konnten in vorangegangenen Studien mittels der akuten sowie chronisch systemischen Applikation des relativ selektiven M4-Rezeptor-Antagonisten Tropicamid moderat ausgeprägte antidystone Effekte beim *dt*^{sz}-Hamster im Sinne einer Verlängerung der Latency on erzielt werden. Die lokale intrastriatale Mikroinjektion dieser Substanz hatte jedoch keinen Einfluss auf die Ausprägung der dystonen Episoden (Smiljanic, 2010). Als Grund hierfür wurde die Beteiligung extrastriataler Hirnregionen oder die nur moderate Selektivität des Tropicamids bezüglich des mAChR vom Subtyp 4 vermutet (Smiljanic, 2010). Da bisweilen allerdings keine hochselektiven M4-Rezeptor-Antagonisten auf dem Markt verfügbar sind, sollte stattdessen mit Hilfe des hochselektiven positiven allosterischen Modulators VU0152100 untersucht werden, inwiefern striatale M4-Rezeptoren tatsächlich in das Dystoniegeschehen bei dt^{sz}-Hamstern involviert sind. Da es sich bei VU0152100 um eine relativ neu entwickelte Substanz handelt (Brady et al., 2008), war nicht genau bekannt, in welchem Ausmaß die BHS tatsächlich passiert wird und ob mit der systemischen Applikation ausreichende Gehirnspiegel der Substanz erreicht würden. Aufgrund dessen wurde VU0152100, trotz der Fähigkeit die BHS zu passieren, direkt intrastriatal appliziert. Da infolge einer Applikation des positiven allosterischen Modulators eine prodystone Wirkung erwartet wurde, wurden für diesen Versuch gezielt Tiere mit niedrigen Dystonie-Scores gewählt, da hohe Schweregrade mögliche Effekte der Substanz maskiert hätten.

Die pharmakologische Manipulation mittels bilateraler intrastriataler Mikroinjektion von VU0152100 hat gezeigt, dass keine der eingesetzten Dosierungen die Erwartung eines prodystonen Effekts beim *dt*^{sz}-Hamster erfüllen konnte. Aufgrund der nur begrenzten Löslichkeit von VU0152100 war eine Dosiserhöhung allerdings nicht möglich. Aber auch die deutlichen Verhaltenseffekte trotz mangelnder Effekte auf die Dystonieschwere sprachen gegen den Einsatz höherer Dosierungen. Das Ausbleiben der prodystonen Effekte bestärkt die Vermutung einer extrastriatalen Beteiligung an den nach systemischer Behandlung mit Tropicamid beobachteten antidystonen Effekten (Smiljanic, 2010).

Präklinische und klinische Daten deuten darauf hin, dass das dopaminerge und das cholinerge System in einem dynamischen Gleichgewicht agieren und dass Veränderungen dieser Balance häufig zu neurologischen Störungen wie der Dystonie führen (Lester *et al.,* 2010). Ein Beispiel für eine extrastriatale Gehirnregion, die an der Manifestation der Dystonie beteiligt sein könnte, ist der pedunculopontine tegmentale Ncl. (PPN). Exzitatorische cholinerge Eingänge dieser Hirnstruktur projizieren direkt zu Dopamin-haltigen Neuronen der Substantia nigra pars compacta (Forster und Blaha, 2003; Wang und Morales; 2009), die ihrerseits wiederum zum Striatum projiziert. Nachdem vorangegangene Studien eindeutig die

kritische Involvierung einer dopaminergen Überschuss-Reaktion am Dystoniegeschehen des *dt*^{sz}-Hamster aufgezeigt haben (Richter, 2005), lässt sich spekulieren, dass die infolge der systemischen Verabreichung des Tropicamids aufgetretenen antidystonen Effekte auf eine Reduktion cholinerger Projektionen des PPN zu dopaminergen Neuronen der SNc zurückgeführt werden könnte.

Wie in Kap. 4.1.1.3.3. beschrieben, wurden bei der histologischen Überprüfung der Lokalisation der implantierten Führungskanülen bei der Mehrheit der mit VU0152100 behandelten Tiere großflächige Veränderungen im Bereich des dorsalen Striatums festgestellt (s. Abb. 28). Da es sich bei dem verwendeten allosterischen Potentiator um eine relativ neu entwickelte Substanz handelt, gibt es bislang keinerlei Literaturangaben zu Verhaltenseffekten nach intrastriataler Applikation bei Nagern, sodass eine Schädigung des Gewebes infolge der lokalen Manipulation des Striatums mit VU0152100 nicht ausgeschlossen werden kann. VU0152100 wurde aufgrund seines hydrophoben Charakters in DMSO 5% gelöst. In einer früheren Studie zur striatalen Manipulation des glutamatergen Systems beim dt^{sz}-Hamster wurden nach intrastriataler Kontrollapplikation von DMSO (5% und 15%) keinerlei Verhaltensauffälligkeiten oder Veränderungen des Gehirngewebes festgestellt (Sander, 2004), sodass auch in der vorliegenden Arbeit die Verwendung von DMSO als Vehikel unbedenklich erschien. Eine neuere Studie hingegen weist auf eine schädliche Wirkung des DMSO auf das ZNS hin. So haben Hanslick und Mitarbeiter (2009) bereits nach Verabreichung geringer Mengen (0,3 ml/kg einer 99,9% igen DMSO-Lösung) einen deutlichen Zelluntergang bei C57/BI6-Mäusen festgestellt, wobei v.a. Striatum und Kortex betroffen waren. Alternativ wäre also auch das verwendete Vehikel als Ursache für die beschriebenen Schädigungen denkbar. Die Studie bezieht sich auf Jungtiere in der frühen Entwicklungsphase (Tag 0-30 post partum), was auch auf die hier verwendeten Hamster zutrifft.

5.2.1.1.5. Akute und chronische systemische Applikationen von Pirenzepin

Da der M1-Rezeptor auch insbesondere in der Peripherie wie beispielsweise präsynaptisch an Motoneuronen lokalisiert ist, wäre es denkbar, dass die antidystone Wirksamkeit von klassischen M1-Anticholinergika wie Trihexyphenidyl auf zusätzliche periphere Effekte zurückzuführen ist. Wäre dies der Fall, würde die neuromuskuläre Synapse ein interessantes Target für die Therapie dystoner Bewegungsstörungen darstellen. Dieser Vermutung wurde in der zugrundeliegenden Arbeit mittels der akuten systemischen Applikation von Pirenzepin, einem M1-spezifischen Antagonisten, der nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (Hammer und Koss, 1979; Carmine und Brogden, 1985), nachgegangen. Die akute i.p. Applikation von Pirenzepin hatte jedoch bei keiner der getesteten Dosierungen (25 und 50 mg/kg) einen Effekt beim *dt^{sz}*-Hamster.

Da Anticholinergika wie bereits erwähnt häufig erst nach einer längeren Behandlungsdauer ihre volle Wirksamkeit entfalten (Jankovic, 2006), erfolgte analog zum Therapieregime bei Dystoniepatienten zusätzlich eine chronische Applikation von Pirenzepin über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass auch eine langfristige Manipulation mit Pirenzepin nicht zu signifikanten Unterschieden in der Dystonieschwere zwischen Pirenzepin- und vehikelbehandelten dt^{sz} -Hamstern führte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen somit nicht die Hypothese einer peripheren Beteiligung mAChR vom Subtyp 1 am Dystoniegeschehen.

In der Tat wird sowohl M1- als auch M2-Rezeptoren eine Schlüsselrolle an der neuromuskulären Synapse zugesprochen (de Matos Silva, 2010; Dudel, 2007), wobei sie hier interessanterweise gegensätzliche Effekte hervorzurufen scheinen (Dudel, 2007; Santafé et al., 2003). So ist bekannt, dass präsynaptische muskarinerge Autorezeptoren vom Typ 1 einen erregenden, während diejenigen vom Typ 2 einen hemmenden Einfluss auf die ACh-Freisetzung an der neuromuskulären Synapse haben (Oliveira et al., 2002). Daher sollten zukünftige Untersuchungen peripher wirksame M2-Modulatoren wie beispielsweise Apamin (de Matos Silva et al., 2010) einschließen, da eine stärkere Wirksamkeit dieser Substanzen bislang nicht ausgeschlossen werden kann. Die in den Versuchen aufgetretene gering- bis mittelgradige Ataxie der Tiere ist ein typischer Verhaltenseffekt, der mit Angaben aus dem Sicherheitsdatenblatt der Firma Sigma Aldrich übereinstimmt. Hier wurden im Rahmen der Toxizitätsbestimmung Ataxien nach oraler Gabe von 5.000 mg/kg Pirenzepin (LD₅₀) bei Ratten beobachtet (Sigma-Aldrich Sicherheitsdatenblatt für "pirenzepine dihydrochloride", Internetlink s. Literaturverzeichnis). Aufgrund der Tatsache, dass Pirenzepin nicht die Blut-Hirn-Schranke passiert, ist diese unerwünschte Wirkung höchstwahrscheinlich auf eine durch die Substanz verursachte Muskelrelaxation zurückzuführen. Damit wird deutlich, dass durch die Applikation von Pirenzepin die M1-Rezeptoren direkt an Motoneuronen blockiert wurden und Effekte von klassischen M1-Anticholinergika wie Trihexyphenidyl bei Patienten vermutlich nicht durch periphere Effekte bedingt sind.

5.2.1.2. Rezeptorautoradiographische Untersuchungen

Vorangehende rezeptorautoradiographische Studien zur Bindung des nicht-selektiven muskarinergen Liganden [³H]-Quinuclidinyl-Benzilat an mAChR zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen *dt*^{sz}-Hamstern und nicht-dystonen Kontrolltieren (Hamann *et al.*, 2006). Obwohl diese Ergebnisse auf ein unter normalen Bedingungen unverändertes striatales cholinerges System hinweisen, können Veränderungen in bestimmten Rezeptorsubtypen aufgrund dieser Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten rezeptorautoradiographischen Analysen
sollten daher Aufschluss über mögliche Veränderungen der Bindungsaffinitäten sowie der Dichte der mAChR vom Subtyp M1 sowie M2/M4 bei *dt^{sz}*-Hamstern geben.

Bei der Auswertung der rezeptorautoradiographischen Analyse von mAChR vom Subtyp1 konnten nach Bonferroni-Holm-Korrektur keine signifikanten Unterschiede zwischen *dt*^{sz}-Hamstern und Kontrolltieren für die einzelnen Gehirnregionen ermittelt werden. Hinsichtlich der [H³]-AFDX-Bindung an den mAChR M2/M4 wurden hingegen signifikante Unterschiede in der Region der lateralen Amygdala sowie dem piriformen Kortex zwischen *dt*^{sz}-Hamstern und Kontrolltieren festgestellt. Aufgrund der Tatsache, dass der eingesetzte Ligand ähnliche Affinitäten gegenüber M2- als auch M4-Rezeptoren aufweist (Piggott *et al.*, 2002), können die Veränderungen jedoch keinem der Rezeptorsubtypen eindeutig zugeordnet werden. Aussagen über eventuelle Veränderungen explizit des M4-Rezeptors sind daher nicht möglich.

Zusammen mit den Ergebnissen vorangehender immunhistochemischer Untersuchungen, die eine unveränderte Dichte striataler cholinerger Interneurone beim dt^{sz}-Hamster im Vergleich zu nicht-dystonen Kontrollhamstern ergaben (Hamann et al., 2006), sprechen die Befunde der vorliegenden Arbeit daher gegen eine kritische Beteiligung der striatalen cholinergen Neurotransmission. Die unveränderte bzw. lediglich geringgradig veränderte Bindungsaffinität von mAChR beim dt^{sz} -Hamster, welche in Abwesenheit dystoner Episoden ermittelt wurde, schließt jedoch die Möglichkeit einer sekundären Veränderung der Bindungsaffinität während einer dystonen Episode nicht aus. In Anbetracht der lediglich moderaten antidystonen Effekte, die in der vorliegenden Arbeit aber auch in vorangehenden Studien (Löscher und Fredow, 1992) nach Gabe von anticholinergen Substanzen beim dt^{sz}-Hamster beobachtet wurden, scheint diese Hypothese jedoch eher unwahrscheinlich. Auch der nicht-selektive mAChR-Agonist Pilocarpin führte lediglich zu einer moderaten Verschlimmerung der dystonen Bewegungsstörungen bei der Hamstermutante (Löscher und Fredow, 1992). Darüber hinaus wurden in der zuvor genannten Studie keinerlei Anzeichen einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber den eingesetzten anticholinergen und cholinergen Substanzen beim dt^{sz}-Hamster festgestellt, was ebenfalls gegen Abweichungen in der Affinität oder Dichte mAChR spricht.

5.2.2. DYT1-Maus

5.2.2.1. Pharmakologische Manipulation des cholinergen Systems

Wie bereits beschrieben, deuten *in-vitro* Untersuchungen der hier verwendeten DYT1-Mäuse auf Fehlfunktionen des cholinergen Systems im Striatum hin, was mit Beobachtungen einer antidystonen Wirkung infolge einer längeren Gabe von mAChR-Antagonisten bei vielen DYT1-Patienten übereinstimmt (Jankovic, 2006). Daher wird vermutet, dass eine erhöhte cholinerge Aktivität eine wichtige Rolle bei diesem DYT1-Mausmodell spielen könnte (Martella *et al.*, 2009; Pisani *et al.*, 2006). Der funktionellen Relevanz der vorherigen *in-vitro* Befunde sollte mit Hilfe der im Rahmen dieses Promotionsvorhabens durchgeführten pharmakologischen *in-vivo* Versuche nachgegangen werden. Hierzu wurden verschiedene verhaltensanalytische Untersuchungen nach akuter und chronischer systemischer sowie nach lokaler striataler Applikation des Cholinomimetikums Pilocarpin durchgeführt, wobei besonderes Augenmerk auf die mögliche Provokation dystoner Bewegungsstörungen gelegt wurde.

5.2.2.1.1. Einmalige systemische Applikation von Pilocarpin

Die einmalige systemische Applikation von Pilocarpin führte zu einer Reduktion sowohl der horizontalen als auch vertikalen lokomotorischen Aktivität innerhalb beider Tiergruppen, allerdings traten die Effekte unabhängig von der verabreichten Dosis auf. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen konnten nicht festgestellt werden, jedoch zeigten DYT1-Mäuse in der Vehikelgruppe zu 100 mg unerwartet eine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant verminderte horizontale Aktivität. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen einer vorangehenden Studie, in der Hewett und Mitarbeiter (2010) bei unbehandelten hMT-Mäusen eine im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren geringere Bewegungsaktivität im O-Maze feststellten, die auch nach Gabe von Amphetamin zu beobachten war. Außerdem wurde eine verringerte durch Amphetamin induzierte Dopaminausschüttung im Striatum dieser Mäuse nachgewiesen (Balcioglu et al., 2007), weshalb die Autoren Fehlfunktionen der dopaminergen Neurotransmission als Ursache für die reduzierte Aktivität bei DYT1-Mäusen vermuteten. Da dieser Effekt in der vorliegenden Arbeit jedoch nur ein Mal im gesamten Versuchsdurchlauf beobachtet werden konnte, handelte es sich hierbei wahrscheinlich eher um ein Artefakt als eine auf dem Genotypbasierende Verhaltensauffälligkeit. Als weiterer Grund für die reduzierte Bewegungsaktivität wäre ein Trainingseffekt denkbar, da die Tiere, wie bereits bei der Diskussion der Methodik beschrieben, mehrfach in den Versuchen eingesetzt wurden und somit eine Habituation an die Versuchsapparatur nicht ausgeschlossen werden kann. Im Hinblick auf die substanzbedingten Nebenwirkungen zeigten alle substanzbehandelten DYT1- und Wildtyp-

Mäuse einen deutlichen Anstieg des Pilocarpin-Scores, der in der höchsten Dosierung von 125 mg/kg Pilocarpin am stärksten ausgeprägt war. Hierbei war insbesondere der Parameter Hypolokomotion/Akinesie erhöht. Diese Beobachtung findet Bestätigung in einer Studie von Turski et al. (1984), in der eine dosisabhängige Abnahme der Aktivität bis hin zur Akinesie bei gesunden C57/BI6-Mäusen infolge einer i.p. Applikation von Pilocarpin nachgewiesen wurde. So ist es möglich, dass die in eigenen Versuchen beobachtete teils hochgradige Hypolokomotion zu Beeinträchtigungen der Tiere in den Verhaltens- und Motoriktests führte, was auch den Ausfall bzw. die Beeinträchtigung des Stellungs- und Haltungsreflexes bei einigen Mäusen sowie die beschriebene reduzierte Aktivität im Activity Cage erklären würde. Die nach Applikation der höchsten Dosierung (125 mg/kg) beobachteten Defizite in der Rotarod-Performance innerhalb beider Gruppen lassen sich vermutlich ebenfalls mit substanzbedingten Effekten begründen, da das Koordinationsvermögen bei DYT1- und Wildtyp-Mäusen gleichermaßen beeinträchtigt war. Vehikelbehandelte DYT1-Mäuse sowie Wildtyp-Tiere schienen hingegen keine Schwierigkeiten auf dem Rotarod zu haben, was mit Ergebnissen einer vorangehenden Studie zum Koordinationsvermögen dieser Mäuse übereinstimmt (Zhao et al., 2008). Im Gegensatz hierzu wiesen Sharma et al. (2005) in der gleichen Mauslinie deutliche Defizite in der Rotarod-Performance bei 9 Monate alten hMT-Mäusen nach, die jedoch lediglich nach wiederholtem Testen auftraten und daher mit Störungen des motorischen Lernens in Zusammenhang gebracht wurden. Weshalb die Ergebnisse dieser Studien trotz derselben Mauslinie unterschiedlich ausfielen, ist vermutlich durch Unterschiede im Versuchs-Design sowie dem jüngeren Alter und der späteren Generation der verwendeten Tiere der jeweiligen Studie bedingt.

Im Hinblick auf die Überprüfung der neuromuskulären Kraft hatte Pilocarpin weder im Gripstrength noch im Wire-hang Test Einfluss auf die Griffstärke. Bei der Beurteilung des Gangbildes im Footprint-Test wurde im Vergleich zur Vehikelgabe eine deutliche Reduktion der Schrittlänge bei DYT1- und Wildtyp-Mäusen festgestellt, Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen lagen hierin jedoch nicht vor. Der Vergleich der rechten und linken Körperseite innerhalb der jeweiligen Tiergruppe ergab ebenfalls unterschiedliche Schrittlängen und zwar bei der Wildtyp-Vehikelkontrolle zu 75 mg, als auch bei der DYT1-Vehikelkontrolle zu 100 mg, was folglich nicht auf substanzbedingte bzw. Genotypassoziierte Effekte zurückzuführen ist. Da auch die Auswertung der übrigen Parameter lediglich marginale Unterschiede mit teils widersprüchlichen Veränderungen erbrachte und auch keinerlei Dosis-Wirkungs-Beziehung ersichtlich war, ließen sich keine eindeutig abweichenden Reaktionen gegenüber der Testsubstanz zwischen transgenen DYT1-Mäusen und Wildtyp-Tieren mittels des Footprint-Tests ermitteln.

Da durch die einmalige systemische Applikation des Cholinomimetikums Pilocarpin keine signifikanten Unterschiede zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen auftraten, deuten die

Ergebnisse des akuten Versuches insgesamt auf eine für beide Tiergruppen vergleichbare Empfindlichkeit gegenüber der Testsubstanz hin. Des Weiteren konnten während dieses Versuches mit keiner der eingesetzten Dosierungen eine Dystonie-Symptomatik in diesem Mausmodell induziert werden. Daher kann eine funktionelle Relevanz der vorherigen *in-vitro* Befunde von Martella *et al.* (2009) und Pisani *et al.* (2006) durch die hier durchgeführte akut systemische Pilocarpingabe nicht bestätigt werden.

5.2.2.1.2. Tägliche systemische Applikation von Pilocarpin über einen Zeitraum von 21 Tagen

Nachdem die akute Applikation von Pilocarpin keine aussagekräftigen Unterschiede zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen ergab, sollte mittels täglicher Applikation von Pilocarpin über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht werden, ob durch die chronische Manipulation des cholinergen Systems bei den DYT1-Mäusen dystone Bewegungsstörungen oder Fehlhaltungen induzierbar sind bzw. eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Auftreten von substanzbedingten Nebenwirkungen bei DYT1-Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen beobachtet werden kann.

Nach Langzeitbehandlung mit Pilocarpin in einer Dosierung von 100 mg/kg in Kombination mit 1 mg/kg N-Methyl-Scopolamin waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der lokomotorischen Aktivität, der neuromuskulären Kraft im Wire-hang Test oder der neurologischen Reflexe zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen aufgetreten, was mit den Ergebnissen der einmaligen systemischen Applikation des Pilocarpins vergleichbar war. Interessanterweise konnte hier aber an Tag 7 ein tendenziell höherer Pilocarpin-Score bei DYT1-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren festgestellt werden, welcher möglicherweise als Hinweis auf eine höhere Empfindlichkeit des cholinergen Systems bei DYT1-Mäusen gedeutet werden kann. Die Tatsache, dass dieser Effekt lediglich an Tag 7 der 21tägigen Behandlung aufgetreten ist, nicht jedoch an den darauffolgenden Testtagen, mag in der Entwicklung einer Toleranz gegenüber dem Wirkstoff begründet sein, was auch bei Dystoniepatienten während langfristiger pharmakologischer Manipulationen des cholinergen Systems, beispielsweise mit Anticholinergika wie Trihexyphenidyl, beschrieben wurde (Jankovic, 2006). Allerdings sprechen die Ergebnisse der weiteren Tests gegen diese Vermutung, denn hierbei beobachtete Unterschiede zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen waren auch noch nach Tag 7 vorhanden. So wiesen DYT1-Mäuse eine über den gesamten Behandlungszeitraum (statistische Auswertung der Zeitspanne von Tag 7 bis Tag 21) tendenziell schlechtere Rotarod-Performance sowie an Tag 21 eine tendenziell geringere Griffstärke im Grip-strength Test im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf, was die Hypothese einer höheren Empfindlichkeit bei DYT1-Mäusen gegenüber der Testsubstanz bestärkt. Allerdings bleibt unklar, wieso die Tiere nur im Rahmen bestimmter Tests Veränderungen aufwiesen. Zudem waren die beschriebenen Veränderungen nur moderat ausgeprägt. Es wurde davon abgesehen, die chronische Applikation auf einen längeren Zeitraum auszudehnen bzw. eine höhere Dosierung einzusetzen, weil hierüber die Gefahr der Induktion epileptischer Anfälle bestand.

Zwar ergab die längerfristige Manipulation des cholinergen Systems teils eine höhere Empfindlichkeit bei DYT1-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren in Bezug auf das Auftreten substanzbedingter Nebenwirkungen, aber auch hier war es nicht gelungen, dystone Symptome in diesem Mausmodell zu provozieren.

5.2.2.1.3. Striatale Mikroinjektionen von Pilocarpin

Um der funktionellen Bedeutung der im Rahmen von *in-vitro* Untersuchungen postulierten striatalen Veränderungen des cholinergen Systems bei dem hier untersuchten DYT1-Mausmodell weiter nachzugehen, wurde zusätzlich zur systemischen Gabe des Cholinomimetikums Pilocarpin auch eine direkte lokale Applikation in das Striatum vorgenommen.

Wie bereits in Kap. 4.2.2.3. beschrieben, entwickelten einige Tiere infolge der intrastriatalen Applikation von Pilocarpin fokale bis hin zu generalisierten epileptischen Anfällen, sodass aufgrund der dadurch bedingten motorischen Beeinträchtigungen nur einige wenige Tiere in den Verhaltenstests untersucht und letztendlich in die statistische Auswertung mit aufgenommen wurden. Die Ergebnisse der Verhaltenstests zu 50 µg/0,5 µl/Hem. von Mäusen, die keine epileptischen Anfälle entwickelt haben, ergaben hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen. Lediglich bei der Überprüfung der Koordinationsfähigkeit wurde eine tendenziell schlechtere Rotarod-Performance bei DYT1-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren festgestellt. Darüber hinaus zeigten DYT1-Mäuse häufiger signifikante Unterschiede im Vergleich zur Vehikelkontrolle als Tiere der Wildtyp-Gruppe, wie beispielsweise bei der lokomotorischen Aktivität im Activity Cage sowie in Bezug auf den Pilocarpin-Score, was als höhere Empfindlichkeit der DYT1-Mäuse gegenüber Pilocarpin gewertet werden könnte. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Anzahl der Wildtyp-Tiere aufgrund der epileptischen Anfälle stark reduziert war, sodass das Ausbleiben signifikanter Veränderungen innerhalb der Wildtyp-Gruppe auch durch die im Vergleich zu DYT1-Mäusen geringere Tierzahl bedingt sein könnte. Dystone Symptome bei DYT1-Mäusen infolge der lokalen Manipulation des cholinergen Systems konnten nicht hervorgerufen werden.

In einer Studie von Martella *et al.* (2009), in der die striatale glutamaterge synaptische Plastizität bei den hier verwendeten Mäusen untersucht wurde, zeigte sich, dass ein erhöhter cholinerger Tonus im Striatum sowie die entsprechend stärkere Aktivierung von mAChR vom

Subtyp 1 zu wesentlichen Veränderungen der kortiko-striatalen synaptischen Plastizität bei DYT1-Mäusen führt. Diese äußerten sich in einer erhöhten LTP, einer erniedrigten Langzeit-Depression (engl.: long-term depression, abgekürzt LTD) sowie der Unfähigkeit, die LTP zu reduzieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Normalisierung des striatalen ACh-Spiegels bzw. die Antagonisierung von mAChR des Subtyp 1 u.a. mit Trihexyphenidyl eine vollständige Wiederherstellung der physiologischen synaptischen Plastizität bei diesen Tieren bewirkt. Ähnliche Veränderungen hinsichtlich der synaptischen Plastizität wurden auch bei M2/M4 (---) knock-out Mäusen nachgewiesen, bei denen ein erhöhter ACh-Spiegel dokumentiert wurde (Martella et al., 2009). Interessanterweise gibt es mehrere Mechanismen, über die endogenes ACh Einfluss auf die synaptische Plastizität ausüben kann. GABAerge Projektionsneurone (MSNs) exprimieren M1-AChR, welche die kortikostriatale LTP fördern (Calabresi et al., 2000) und die LTD-Induktion hemmen (Wang et al., 2006). Striatales ACh ist somit in der Lage, die Projektionsneurone des direkten und diejenigen des indirekten Weges auf unterschiedliche Art und Weise zu beeinflussen, indem es über M1-AChR die Physiologie der D1 gegenüber der D2 MSNs unterschiedlich reguliert (Shen, 2007). Des Weiteren scheint es, dass lediglich die MSNs des direkten Weges zusätzlich M4-AChR aufweisen, obgleich beide Typen an MSNs M1-AChR exprimieren (Ince et al., 1997; Yan et al., 2001). Darüber hinaus wäre auch eine indirekte modulatorische Funktion bezüglich der kortiko-striatalen synaptischen Plastizität durch die Regulierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen auf lokalen inhibitorischen Projektionen zwischen MSNs denkbar (Perez-Rosello et al., 2005). Diese Befunde deuten darauf hin, dass Störungen der cholinergen Neurotransmission bezüglich Veränderungen der synaptischen Plastizität, wie sie bei den DYT1-Mäusen nachgewiesen wurden, eine wichtige Rolle spielen könnten (Martella et al., 2009). Zudem könnten diese Erkenntnisse eine plausible Erklärung für die Effektivität von Anticholinergika bei der Behandlung von Patienten mit generalisierter Dystonie liefern. Auch die in eigenen Untersuchungen beobachtete tendenziell, jedoch nicht signifikant höhere Inzidenz von epileptischen Anfällen bei DYT1-Mäusen nach wiederholter lokaler striataler Applikation von Pilocarpin im Vergleich zu Wildtyp-Tieren könnte auf eine veränderte synaptische Plastizität bei diesen Mäusen hindeuten. Allerdings war die auszuwertende Anzahl an Tieren zu gering, um eindeutige Aussagen treffen zu können. Zudem ist Pilocarpin, wie bereits beschrieben, ein nicht-selektiver AChR-Agonist, sodass nicht bekannt ist, welcher Rezeptor-Subtyp letztendlich dosisabhängig stimuliert wurde.

Abschließend bleibt festzustellen, dass im Rahmen der pharmakologischen Untersuchungen eines der Hauptziele, nämlich das Provozieren einer Dystonie-Symptomatik im DYT1-Mausmodell, durch keine Applikationsform erreicht werden konnte. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen bei anderen für die TD vorgeschlagenen transgenen Mausmodellen (Shashidharan *et al.*, 2005; Grundmann *et al.*, 2007), die ebenfalls keinen dystonen Phänotyp aufweisen. Aufgrund dessen sind diese Tiermodelle für präklinische Arzneimitteltestungen weniger geeignet, denn sie erlauben keine Aussagen zur antidystonen Wirkung der zu untersuchenden Wirkstoffe. Allerdings können diese ätiologischen Modelle Aufschlüsse über die Physiologie des Genprodukts sowie Einblicke in die Pathophysiologie der Erkrankung geben.

Allgemein sollte berücksichtigt werden, dass kein Tiermodell allein in der Lage ist, eine humane Erkrankung in ihrer Komplexität (molekulare, zelluläre und physiologische Merkmale) darzustellen (Zhao et al., 2008). Das heißt, dass der Einbau eines humanen Defektgens in das Genom eines tierischen Organismus nicht unbedingt zu einem der menschlichen Erkrankung vergleichbaren Phänotyp führen muss. Des Weiteren wird die zeitliche und räumliche Anordnung der Transgenexpression in transgenen Tiermodellen durch den verwendeten Promotor, das Konstruktdesign sowie die Insertionsstelle diktiert (Zhao et al., 2008). So wird auch für die hier verwendeten Mäuse diskutiert, dass die vorhandene Überexpression des humanen Defektgens zu Störungen in anderen physiologischen Abläufen führen kann, was zudem durch die Verwendung von anderen als den physiologischen Promotoren und damit zu einer möglichen Genexpression in nicht physiologischen Geweben begünstigt wird (Dang et al., 2005). Hinzu kommt, dass in diesen transgenen Mauslinien häufig das tierische gesunde neben dem humanen Defektgen vorliegt, wodurch es zu einem Ausgleich der Fehlfunktionen des humanen Defektgens durch das vorhandene gesunde Gen des Tieres kommen kann (Dang et al., 2005). Neuere Ansätze verfolgen daher das Ziel, die dem humanen DYT1-Gen homologe Gensequenz direkt im Mausgenom zu verändern, so wie es von Dang und Mitarbeitern (2005) in einer DYT1-Mauslinie mittels des sog. Cre-lox-Verfahrens durchgeführt wurde. Hierdurch kommt es in diesen DYT1 knock-in Mäusen zu keiner Überexpression des mutierten TorsinA und somit auch nicht mehr zur Konkurrenz zwischen dem gesunden tierischen und dem mutierten humanen TorsinA. Jedoch ist auch hier nicht bekannt, ob die Veränderung der homologen Sequenz im Mausgenom auch tatsächlich zu den gleichen Veränderungen wie beim Menschen führt. So weisen auch die Mäuse von Dang et al. (2005) keinen eindeutigen dystonen Phänotyp auf.

Weiterhin stellt sich die Frage, inwiefern das Auftreten exogener Faktoren in bestimmten Zeit- bzw. Entwicklungsphasen eine Rolle bezüglich der Manifestation dystoner Symptome spielen könnten. Die TD tritt meist zwischen dem 5. und dem 28. Lebensjahr auf, einer bedeutenden Entwicklungsphase, die von einer hohen synaptischen Plastizität und motorischem Lernen gekennzeichnet ist. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass es sich bei der Dystonie um eine neurologische Entwicklungsstörung handeln könnte

(Breakfield et al., 2008; Argyelan et al., 2009; Carbon et al., 2009; Bragg et al., 2011). Interessanterweise zeigen nur 30-40% der Genträger eine dystone Symptomatik. Welche Faktoren letztendlich zur Manifestation der Erkrankung führen, sind bislang nicht bekannt. Der TD liegt eine Mutation im DYT1-Gen zugrunde, das mit der Produktion eines veränderten Proteins, dem mutierten TorsinA in Verbindung gebracht wird. Die Expression des TorsinA Proteins wird zeitlich und räumlich während der Entwicklung reguliert und weist die höchste Expression, gemessen anhand des mRNA Spiegels, in der pränatalen bzw. frühen postnatalen Phase (bis Tag 14 post partum, P14) auf, was eine Beteiligung an der Entwicklung des Nervensystems vermuten lässt. Ergebnisse einer Studie von Sciamanna et al. (2011) demonstrieren, dass das mutierte TorsinA bereits zu einem frühen Zeitpunkt Auswirkungen auf die striatale Funktion hat, sodass vermutet wird, dass der ausschlaggebende exogene Faktor bereits in der frühen Entwicklung Einfluss nehmen muss, damit es zur Manifestation der Dystonie kommt. Die Autoren weisen außerdem darauf hin, dass ein unausgewogenes Zusammenspiel zwischen Dopamin und ACh im Striatum sowie eine genetische Prädisposition zur Ausprägung der Dystonie führen könnte, ihre Ergebnisse belegen jedoch auch, dass weitere Faktoren nötig sind, um das Auftreten der klinischen Symptome auszulösen. So könnten die hier verwendeten Mäuse in einem Alter von ca. 2 Monaten für die Untersuchungen vielleicht schon zu alt gewesen sein, sodass das Zeitfenster einer erhöhten Suszeptibilität bereits überschritten und damit eine Provokation dystoner Bewegungsstörungen nicht mehr möglich war.

5.2.2.2. Immunhistochemische Untersuchungen striataler cholinerger Interneurone in DYT1-Mäusen

Zusätzlich zu den verhaltenspharmakologischen Versuchen sollten immunhistochemische Untersuchungen Aufschluss darüber geben, inwiefern das mutierte Gen Auswirkungen auf das cholinerge System ausüben könnte und ob die beobachteten Veränderungen vielleicht auf Veränderungen in der Verteilung oder der Anzahl striataler cholinerger Interneurone bei den DYT1-Mäusen zurückzuführen sind. Des Weiteren besteht die Hypothese, dass eventuell eine erhöhte Dichte cholinerger Interneurone zu einer erhöhten cholinergen Aktivität im Striatum führen könnte. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Dichte cholinerger Interneurone im Striatum dieser Mäuse bestimmt.

Während Verteilung, Morphologie und Dichte ChAT-immunreaktiver Zellen im Gesamtstriatum bei beiden Tiergruppen vergleichbar waren, ergab die Auswertung der einzelnen Subregionen interessanterweise eine moderat reduzierte Dichte striataler cholinerger Interneurone (-15%) im dorsomedialen Bereich des Striatums bei DYT1-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. In den anderen untersuchten Subregionen des Striatums wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen

festgestellt. Diese Befunde sprechen somit eindeutig gegen die Hypothese einer durch eine höhere Dichte cholinerger Interneurone verursachten cholinergen Überaktivität.

Entsprechend ihrer neuroanatomischen Organisation weisen die ventralen und dorsalen Anteile des Striatums eine funktionelle Diversität auf: Während der sensomotorische Kortex vornehmlich in Richtung des dorsalen Striatums projiziert, ist das ventrale Striatum Zielstruktur für Afferenzen aus dem limbischen und paralimbischen Kortex, der Hippocampus-Formation sowie der Amygdala (Middleton und Strick, 2000; Nakano et al., 2000). Demzufolge könnten die im dorsomedialen Striatum festgestellten Veränderungen als Funktionsstörungen des cholinergen Neurotransmittersystems innerhalb des "motorisch"assoziierten Striatum bei DYT1-Mäusen gewertet werden. Vorangehende Studien deuten auf Imbalancen zwischen dem cholinergen und dem dopaminergen Neurotransmittersystem im Striatum der DYT1-Mäuse hin (Pisani et al., 2006). In Untersuchungen mit Quinpirol, einem Antagonisten an dopaminergen D₂/D₃-Rezeptoren, konnte eine Hemmung der Aktivität cholinerger Interneurone bei Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden. Bei transgenen DYT1-Mäusen führte die Substanz hingegen zu einer Depolarisation und einem Anstieg der neuronalen Feuerrate im Sinne einer Exzitation (Pisani et al., 2006). Darüber hinaus wurde eine erhöhte funktionelle Bereitschaft spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle bei DYT1-Mäusen festgestellt, welche die paradoxe exzitatorische Reaktion gegenüber der Stimulation von D2-Rezeptoren möglicherweise erklären könnte. Die durch Quinpirol hervorgerufene Enthemmung cholinerger Interneurone könnte somit als Versuch, der in dieser Arbeit nachgewiesenen verminderten Dichte dieser Neurone entgegenzuwirken, interpretiert werden.

Alternativ wäre es denkbar, dass die Dichte cholinerger Interneurone im Rahmen von Gegenregulationsprozessen auf eine erhöhte cholinerge Aktivität, wie sie aufgrund verschiedener *in-vitro* Studien bei dieser Mauslinie postuliert wird (Pisani *et al.*, 2006; Martella *et al.*, 2009), kompensatorisch herabreguliert wurde. Abweichungen in der Dichte cholinerger Interneurone wurden auch bei anderen neurologischen Erkrankungen wie Alzheimer oder der L-Dopa-induzierten Dyskinesie beobachtet, bei denen ebenfalls Fehlfunktionen innerhalb des cholinergen Systems vermutet werden (Jenner, 2000; Lehéricy *et al.*, 1989). Die hier diskutierten Hypothesen sind jedoch bislang rein spekulativ und bedürfen weiterführender Untersuchungen. So wäre es interessant, in zukünftigen Studien GABAerge Interneurone bei den DYT1-Mäusen zu untersuchen, da Veränderungen der GABAergen Inhibition zu sekundären Veränderungen des cholinergen Systems führen könnten. Auch immunhistochemische Untersuchungen der Tyrosinhydroxylase, einem Enzym der Dopamin-Biosynthese, könnten sinnvoll sein, um eventuelle Imbalancen zwischen dem dopaminergen und cholinergen System aufzudecken.

5.2.2.3. Westernblot-Analyse der Cholinacetyltransferase

Zur weiteren Aufklärung der pathophysiologischen Bedeutung des cholinergen Systems bei DYT1-Mäusen wurden neben immunhistochemischen Untersuchungen der ChAT zusätzlich Westernblot-Analysen des Proteins vorgenommen, um Aussagen über mögliche Veränderungen auch in anderen Gehirnregionen treffen zu können.

Bei Betrachtung der Abb. 43 (s. Kap. 4.2.4) deutet sich an, dass die ChAT-Expression im Bereich des Cerebellum (beispielhaft ist die 68 kDa Bande dargestellt) bei DYT1-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren stärker exprimiert ist. Unter Einbeziehung <u>aller</u> detektierten Banden konnten jedoch keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen festgestellt werden. Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse bestätigen für das Striatum die zuvor beschriebenen immunhistochemischen Befunde, die, bezogen auf das <u>Gesamt</u>striatum (s. Abb. 41), ebenfalls keine Unterschiede zwischen transgenen DYT1- und Wildtyp-Mäusen ergaben.

Die im Rahmen der immunhistochemischen Analyse ermittelte signifikante Reduktion cholinerger Interneurone innerhalb der dorsomedialen Subregion des Striatums bei DYT1-Mäusen, ließ sich mittels der Westernblot-Analyse nicht detektieren, da mit diesem Verfahren nur das Gesamtstriatum untersucht werden kann, d.h. keine Aussagen zu den einzelnen Subregionen möglich waren.

Wie bereits in Kap. 5.1.2.5. beschrieben, ergab die Westernblot-Analyse unter anderem eine Bande in Höhe von 56 kDa, welche laut Datenbank des Blast Search mit einem für die Maus relevanten Kalium-Kanal im Gehirn (Kv-Kanal) korreliert. Dieser Befund ist insofern interessant, als dass Kv-Kanäle eine große Rolle bei der neuronalen Erregbarkeit spielen und Mutationen dieser Kanäle häufig mit neurologischen Erkrankungen wie beispielsweise der Epilepsie in Verbindung gebracht werden (Singh *et al.*, 1998; Biervert *et al.*, 1998; Maljevic *et al.*, 2008). Auch im Hinblick auf die Dystonie könnten Kv-Kanäle von Interesse sein. So konnte in vorangehenden Untersuchungen nach systemischer Applikation des Kv7.2-7.5-Kanalöffners Retigabin ein antidystoner Effekt bei *dt^{sz}*-Hamstern nachgewiesen werden (Richter *et al.*, 2006). Da die ermittelten Banden in Höhe von 56 kDa bei DYT1- als auch Wildtyp-Mäusen gleichermaßen exprimiert waren, scheinen Kv-Kanäle nicht unbedingt eine zentrale Rolle in diesem Mausmodell zu spielen. Allerdings sind diese Untersuchungen allein nicht aussagekräftig, weshalb dieser Befund durch weiterführende Westernblot-Analysen von Kv-Kanälen belegt werden sollten.

Die Befunde der Westernblot-Analyse der ChAT-Expression sprechen grundsätzlich nicht für eine maßgebliche Veränderung des cholinergen Neurotransmittersystems bei diesem DYT1-Mausmodell.

5.3. Schlussbetrachtungen

Erkenntnisse aus der Neurobiologie, Befunde funktioneller Bildgebungsstudien sowie postmortem Daten lassen vermuten, dass Fehlfunktionen innerhalb des striatalen cholinergen Systems maßgeblich an der Pathogenese von Bewegungsstörungen wie der Dystonie beteiligt sind (Bonsi *et al.*, 2011). Welche Mechanismen genau hierbei eine Rolle spielen, bleibt bislang jedoch unklar. Ziel dieses Promotionsvorhabens war es daher, mittels pharmakologischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Untersuchungen in zwei anerkannten Tiermodellen für Dystonien die pathophysiologische Bedeutung des cholinergen Neurotransmittersystems, insbesondere der mAChR, genauer zu beleuchten und damit einen Beitrag zur Verbesserung der Therapieansätze zu leisten.

Im Gegensatz zu früheren Studien, in denen deutliche dosisabhängige Effekte nach Verabreichung GABAmimetischer bzw. antidopaminerger Substanzen beschrieben wurden, führten pharmakologische Manipulationen des cholinergen Systems mit zentral wirksamen M1- und M4-Rezeptor-Antagonisten im *dt*^{sz}-Hamster lediglich zu moderaten antidystonen Effekten. Allerdings schien die kombinierte Verabreichung des M1-Antagonisten Trihexyphenidyl und des relativ selektiven M4-Antagonisten Tropicamid eine im Vergleich zur alleinigen Applikation der beiden Substanzen stärkere Effektivität aufzuweisen. Dieser Befund erwies sich im Rahmen der Langzeitbehandlung über 21 Tage teils reproduzierbar, eine erhoffte Potenzierung der antidystonen Wirksamkeit im Vergleich zur einmaligen systemische Gabe der mAChR-Antagonisten konnte jedoch nicht erzielt werden. Dennoch könnte eine kombinierte Behandlung mit M1- und M4-Antagonisten eine interessante neue Option für die Therapie von Dystonien darstellen. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass Substanzen mit einer im Vergleich zu Tropicamid höheren Selektivität gegenüber mAChR vom Subtyp 4, die in Zukunft zur Verfügung stehen könnten, einen stärkeren antidystonen Effekt hervorrufen könnten.

Wider Erwarten hatte die bilaterale intrastriatale Applikation der mAChR-Antagonisten im Gegensatz zu den systemischen Applikationen keine antidystonen Effekte zur Folge, was durch die striatale Applikation des positiven allosterischen Modulators VU0152100, die ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Dystonie bei den *dt^{sz}*-Hamstern hatte, Bestätigung findet. Diese Befunde lassen eine Involvierung des cholinergen Systems in extrastriatalen Hirnregionen vermuten. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen sollten daher lokale Manipulationen auch anderer Hirnstrukturen, die eine cholinerge Aktivität aufweisen, wie beispielsweise dem pedunculopontine Ncl., in Betracht gezogen werden.

Die rezeptorautoradiographischen Untersuchungen zur Bindungsaffinität und Dichte der mAChR vom Subtyp 1 sowie Subtyp 2/4 ergaben ebenfalls keine weitreichenden Veränderungen bei den dt^{sz} -Hamstern. Insgesamt sprechen die Resultate der

Untersuchungen beim *dt*^{sz}-Hamster daher gegen eine kritische Beteiligung der striatalen cholinergen Neurotransmission am Dystoniegeschehen bei der Hamstermutante. Allerdings muss hierbei der Mangel an hochselektiven Antagonisten für M4-Rezeptoren in Betracht gezogen werden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass durch Substanzen mit einer höheren Selektivität gegenüber M4-Rezeptoren stärkere Effekte erzielt worden wären. Daher ist es notwendig, dass Substanzen mit einer höheren Selektivität gegenüber den einzelnen Rezeptorsubtypen entwickelt werden, um einerseits genauere Einblicke in die Pathophysiologie der mAChR zu erhalten und andererseits die Entwicklung neuer anticholinerger Therapeutika mit einer höheren Effektivität bei gleichzeitiger Optimierung der Verträglichkeit voranzutreiben.

Weiterhin wäre es interessant, in zukünftigen Studien auch Modulatoren an nAChR zu untersuchen, da es vermehrt Belege dafür gibt, dass sie interessante Kandidaten für die Therapie von Bewegungsstörungen darstellen könnten (zur Übersicht: Huang *et al.*, 2011).

Die Identifizierung ursächlicher Gendefekte bei Menschen mit unterschiedlichen Dystonieformen ermöglichte es, dass innerhalb der letzten Jahre verschiedene ätiologische Mausmodelle für die Dystonie generiert wurden (Breakefield *et al.*, 2008). Unter anderem wurden auch für die Early-onset-TD, die durch den DYT1-Gendefekt verursacht wird, verschiedene transgene Mauslinien erstellt (Sharma *et al.*, 2005; Shashidharan *et al.*, 2005; Grundmann *et al.*, 2007), die jedoch alle keine Dystonie-Symptomatik entwickeln und somit nicht für die präklinische Arzneimittelforschung geeignet sind. Allerdings könnten diese Tiermodelle Einblicke in die Pathophysiologie des Genproduktes geben sowie einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Faktoren leisten, die bei nur ca. 30-40% aller Genträger zur Ausprägung einer Dystonie-Symptomatik führen.

Vorangehende *in-vitro* Untersuchungen der in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse lieferten zahlreiche Hinweise auf Fehlfunktionen des cholinergen Systems im Striatum. Daher wird vermutet, dass eine erhöhte cholinerge Aktivität eine wichtige Rolle bei diesem DYT1-Mausmodell spielen könnte (Martella *et al.*, 2009; Pisani *et al.*, 2006). Die im Rahmen dieses Promotionsvorhabens durchgeführten pharmakologischen *in-vivo* Versuche sollten daher klären, inwiefern eine striatale cholinerge Überaktivität eine funktionelle Relevanz für die Manifestation von Dystonien bei diesen Mäusen haben könnte.

Durch die pharmakologische Manipulation des cholinergen Systems mit dem Cholinomimetikum Pilocarpin konnte allerdings weder eine dystone Symptomatik provoziert werden, noch traten deutlich abweichende Reaktionen im Verhalten oder der Motorik der DYT1-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf, was auf eine höhere Suszeptibilität der DYT1-Mäuse gegenüber einer cholinergen Überaktivität hingewiesen hätte. Zusammen mit den Ergebnissen einer nahezu unveränderten Dichte an cholinergen Interneuronen sowie fehlenden Veränderungen bezüglich der Expression der ChAT in unterschiedlichen Gehirnregionen, lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Hypothese einer funktionellen Relevanz des cholinergen Systems, die in vorherigen Befunden postuliert wurde, durch die vorliegenden Ergebnisse dieser Studie nicht bestätigt werden konnte.

Jedoch ist zu bedenken, dass durch den bisherigen Einsatz des nichtselektiven AChR-Agonisten Pilocarpin keine Aussage zur pathophysiologischen Beteiligung einzelner Rezeptorsubtypen möglich ist. Dieser Frage sollte durch rezeptorautoradiographische Analysen weiter nachgegangen werden.

Analog zu den Beschreibungen in Dystoniepatienten deuten Untersuchungen von DYT1-Mäusen vermehrt auf Imbalancen zwischen dem cholinergen und dem dopaminergen Neurotransmittersystem hin (Pisani *et al.*, 2006; Bao *et al.*, 2010). So ergaben *in-vitro* Untersuchungen Unterschiede zwischen DYT1- und Wildtyp-Mäusen in der neuronalen Erregbarkeit cholinerger Neurone durch den Einsatz dopaminerger Substanzen (Pisani *et al.*, 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz cholinerger Substanzen eine veränderte striatale DA-Freisetzung bei DYT1-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vorliegt (Bao *et al.*, 2010). Im Hinblick auf die enge Interaktion von ACh und DA innerhalb der Basalganglien, wäre es daher interessant, in zukünftigen Untersuchungen zu klären, ob durch eine kombinierte Verabreichung von cholinergen und dopaminergen Substanzen und einem damit einhergehenden synergistischen Effekt dystone Symptome provoziert werden können.

Zahlreiche Studien, insbesondere Studien an Patienten mit fokalen Dystonien, deuten darauf, dass diese ursächlich durch den Verlust der GABAergen Inhibition bedingt sein könnten (Hallett, 2004 und 2011, Levy und Hallett, 2002). Als mögliche Ursache hierfür wird ein Defizit an inhibitorischen GABAergen Interneuronen vermutet, das sekundär eine cholinerge bzw. dopaminerge Überaktivität verursachen könnte (Hallett, 2011). Auch im Hinblick auf defiziente GABAerge Interneurone im *dt*^{sz}-Hamstermodell (Gernert *et al.*, 2000). wäre es daher interessant, a) im Rahmen weiterführender immunhistochemischer Untersuchungen die Dichte verschiedener GABAerger Interneurone auch bei DYT1-Mäusen zu analysieren und b) im Rahmen weiterführender pharmakologischer Untersuchungen zusätzlich zu einer Modulation des cholinergen und dopaminergen Systems der Bedeutung des GABAergen Systems nachzugehen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Dystonien sind schwer therapierbare Bewegungsstörungen, deren Pathophysiologie nahezu ungeklärt ist. Anticholinergika mit Wirkung am muskarinergen Acetylcholinrezeptor vom Subtyp 1 (mAChR1) bewirken zwar bei einigen Dystoniepatienten eine Besserung, rufen jedoch eine Vielzahl schwerwiegender Nebenwirkungen hervor. Für die Entwicklung von Anticholinergika mit einem günstigeren Wirkungsprofil könnte der mAChR4 eine interessante Zielstruktur sein. Ziel dieses Promotionsvorhabens war es daher die pathophysiologische Bedeutung des cholinergen Neurotransmittersystems in zwei anerkannten Dystoniemodellen mittels verschiedener Methoden zu untersuchen, um damit einen Beitrag zur Verbesserung der Therapie von Dystonien zu leisten.

Der *dt*^{sz}-Hamster ist ein Tiermodell für die primäre paroxysmale Dystonie. In vorgegangenen Untersuchungen führte die akute systemische Applikation des mAChR1-Antagonisten Trihexyphenidyl (THP) oder des relativ selektiven mAChR4-Antagonisten Tropicamid nur zu moderaten antidystonen Effekten beim *dt*^{sz}-Hamster (Löscher und Fredow, 1992; Smiljanic, 2010). Daher sollte untersucht werden, ob stärkere Effekte erzielt werden können durch (1) die akute kombinierte Verabreichung von THP plus Tropicamid, (2) eine Verlängerung des Behandlungszeitraums oder (3) die lokale Manipulation striataler mAChR1 und mAChR4. Die Applikation des nur peripher wirksamen mAChR1-Antagonisten Pirenzepin sollte zudem zeigen, inwiefern die bekannte antidystone Wirkung von mAChR1-Antagonisten über periphere Effekte vermittelt wird. Mittels Rezeptorautoradiographie wurde untersucht, ob regionale Veränderungen einzelner mAChR-Subtypen im Gehirn dystoner Hamster bestehen.

Die akute kombinierte Verabreichung von THP und Tropicamid führte in der vorliegenden Studie erwartungsgemäß zu einer stärkeren Effektivität als die alleinige Applikation der beiden Substanzen. Dies konnte allerdings nicht durch eine chronische Gabe potenziert werden. Die wesentlich schwächeren Effekte nach striataler Applikation der beiden Substanzen sowie des allosterischen Modulators VU0152100 am mAChR4 lassen eine Beteiligung extrastriataler Gehirnregionen vermuten. Fehlende Effekte von Pirenzepin sprechen gegen eine Beteiligung peripherer mAChR1 an der antidystonen Wirksamkeit von klinisch eingesetzten mAChR1-Antagonisten. Insgesamt stützen die hier vorliegenden Neurotransmission am Dystoniegeschehen im *dt*^{sz}-Hamster nicht, was zudem durch die nahezu unveränderte Dichte von mAChR1, 2 und 4 in verschiedenen Gehirnregionen unterstrichen wird. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass bislang nicht verfügbare Substanzen mit einer höheren Selektivität gegenüber verschiedenen mAChR-Subtypen stärkere Effekte hervorgerufen hätten.

Verschiedene transgene Mauslinien, die das humane Defektgen (DYT1) der Early-onset-Torsionsdystonie tragen, zeigen keine Dystonie-Symptomatik (Sharma *et al.*, 2005; Shashidharan *et al.*, 2005; Grundmann *et al.*, 2007). Diese Mäuse können zum Verständnis beitragen, warum nur ca. 30-40% der humanen DYT1-Genträger Dystonien entwickeln und welche Faktoren zur Manifestation führen. Vorangehende *in-vitro* Untersuchungen der in dieser Arbeit verwendeten DYT1-Mäuse lassen vermuten, dass die DYT1-Mutation eine Überaktivität des cholinergen Systems bewirkt (Martella *et al.*, 2009; Pisani *et al.*, 2006). Mit Hilfe der hier durchgeführten pharmakologischen *in-vivo* Untersuchungen sollte der funktionellen Relevanz der vorherigen *in-vitro* Befunde nachgegangen werden, wobei besonderes Augenmerk auf die mögliche Provokation dystoner Symptome gelegt wurde. Weiterhin sollte durch immunhistochemische Untersuchungen geklärt werden, ob der zuvor ermittelten cholinergen Überaktivität eine erhöhte Dichte striataler cholinerger Interneurone zugrunde liegt. Westernblot-Analysen sollten zudem klären, ob eine durch die DYT1-Mutation verursachte erhöhte Expression des für die ACh-Synthese wichtigen Enzyms Cholinacetyltransferase (ChAT) vorliegt.

Durch die akute und chronische Applikation des Cholinomimetikums Pilocarpin konnte keine Dystonie bei DYT1-Mäusen provoziert werden. Allerdings zeigten DYT1-Mäuse nach chronischer Gabe ein tendenziell stärkeres Auftreten von Nebenwirkungen, was auf eine Störung des cholinergen Systems bei diesen Tieren hindeuten könnte. Durch die leicht erhöhte Inzidenz von epileptischen Anfällen nach wiederholter intrastriataler Applikation von Pilocarpin könnte über eine veränderte synaptische Plastizität bei DYT1-Mäusen spekuliert werden. Insgesamt unterstützen diese Befunde, eine nahezu unveränderte Dichte striataler cholinerger Interneurone sowie eine zu Wildtyp-Mäusen vergleichbare Expression der ChAT in verschiedenen Gehirnregionen nicht die Hypothese einer funktionellen Relevanz der zuvor mittels *in-vitro* Untersuchungen ermittelten striatalen cholinomimetikums Pilocarpin und eine Beschränkung auf systemische und intrastriatale pharmakologische Manipulationen kann bislang jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass nur bestimmte mAChR-Subtypen bzw. extrastriatale Gehirnregionen pathophysiologisch involviert sind. Dieser Frage sollte durch weiterführende rezeptorautoradiographische Untersuchungen nachgegangen werden.

7. SUMMARY

Jagoda Kuschka

Examinations on the pathophysiological role of muscarinic acetylcholine receptors in models of dystonia

Dystonia is a movement disorder, which is often intractable. Its pathophysiology is poorly understood. Anticholinergic drugs which are selective for the muscarinic acetylcholine receptor subtype 1 (mAChR1) exert beneficial effects in some patients but also provoke a wide range of severe side effects. In order to develop anticholinergics with an improved efficacy and safety, the mAChR4 seems to be an interesting therapeutical target. The aim of this study was to further clarify the pathophysiological role of the cholinergic system by using different methods in two established animal models of dystonia and thus contribute to the improvement of therapeutic strategies.

The *dt^{sz}* hamster represents an animal model of primary paroxysmal dystonia. As indicated by previous studies, the acute systemic administration of the mAChR1-antagonist trihexyphenidyl (THP) or of the relatively selective mAChR4-antagonist tropicamide exerted only moderate antidystonic effects in *dt^{sz}* hamsters (Löscher and Fredow, 1992; Smiljanic, 2010). Therefore, it should be examined whether stronger effects could be achieved by (1) the acute combined administration of THP and tropicamide, (2) long-term treatment, or (3) a local manipulation of striatal mAChR1 and mAChR4. Furthermore, the administration of the peripherally active mAChR1-antagonist pirenzepine should elucidate if the known antidystonic efficacy of mAChR1-antagonists may be mediated by peripheral effects. In addition, autoradiographic analysis was performed to clarify if there are distinct alterations of mAChR-subtypes in brain regions of dystonic hamsters.

In the present investigations, the acute combined treatment with THP and tropicamide resulted in a greater efficacy than the application of the single compounds. However, this efficacy could not be potentiated by chronic treatment. Striatal microinjections of both compounds or the mAChR4-selective allosteric modulator VU0152100 exerted weaker effects, indicating that systemic effects are mediated by extrastriatal brain regions. The lack of efficacy of pirenzepine suggests that beneficial effects of clinically used mAChR1-antagonist are not based on peripheral inhibition of the cholinergic system. In summary, the present results did not show a critical involvement of the (striatal) cholinergic system in the dystonic syndrome of the dt^{sz} hamster, as underlined by a widely unchanged density of mAChR1, 2 and 4 in different brain regions. Nevertheless, it cannot be excluded that agents with higher selectivity for mAChR-subtypes, which are not available so far, might exert more pronounced effects.

Different transgenic mouse lines, which carry the human defect gene (DYT1) for the earlyonset torsion dystonia, do not exhibit dystonic symptoms (Sharma *et al.*, 2005; Shashidharan *et al.*, 2005; Grundmann *et al.*, 2007). Nevertheless, these mice may contribute to understand why only 30-40% of the human DYT1 gene carriers develop dystonia and which factors lead to its manifestation. Previous *in-vitro* studies in DYT1 mice, which were used in this work, suggest that the DYT1 mutation results in an overactivity of the cholinergic system (Martella *et al.*, 2009; Pisani *et al.*, 2006). Pharmacological *in-vivo* experiments were carried out to investigate the functional relevance of these *in-vitro* findings, paying particular attention to the possible induction of a dystonic phenotype. Furthermore, it should be clarified by immunohistochemical studies, whether the previously identified cholinergic overactivity is based on an increased density of striatal cholinergic interneurons. Western blot analysis was carried out to elucidate, if the DYT1 mutation is related to an increased expression of choline acetyltransferase (ChAT), the key enzyme for the ACh synthesis.

The acute and chronic administration of the cholinomimetic drug pilocarpine did not provoke dystonia-like movements in DYT1 mice. However, after chronic administration DYT1 mice showed a trend towards more pronounced side effects, which may indicate a disturbance of the cholinergic system in these animals. The slightly increased incidence of epileptic seizures after repeated local striatal administration of pilocarpine let presume an altered synaptic plasticity in DYT1 mice. Together with the findings of an almost unchanged density of striatal cholinergic interneurons as well as the unchanged expression of ChAT in different brain regions in comparison to wild-type mice, the present results do not suggest a functional relevance of a striatal cholinergic overactivity, as previously found in these mice by *in-vitro* experiments. However, with regard to the use of the non-specific cholinomimetic pilocarpine and to a restriction on systemic and intrastriatal pharmacological manipulations, it cannot be excluded, that only certain mAChR-subtypes or extrastriatal brain regions are pathophysiologically involved. This question should be further investigated by receptor autoradiographic studies.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Adler, C. H., Factor, S. A., Brin, M., Sethi, K. D. (2002):

Secondary nonresponsiveness to botulinum toxin type A in patients with oromandibular dystonia.

Mov Disord 17 (1): 158-161.

Albanese, A., Asmus, F., Bhatia, K. P., Elia, A. E., Elibol, B., Filippini, G., Gasser, T., Krauss, J. K., Nardocci, N., Newton, A., Valls-Solé, J. (2010):

EFNS guidelines on diagnosis and treatment of primary dystonias. *Eur J Neurol* 18(1): 5-18.

Albin, R. L. und Mink, J. W. (2006):

Recent advances in Tourette syndrome research. *Trends Neurosci* 29: 175-182.

Albuquerque, E. X., Alkondon, M., Pereira, E. F. R., Castro, N. G., Schrattenholz, A., Barbosa, C. T., Bonfante-Cabarcas, R., Aracava, Y., Eisenberg, H. M., Maelicke, A. (1997):

Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function.

J Pharmacol Exp Ther 280: 1117-1136.

Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., Rogers, S. W. (2009):

Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89: 73-120.

Aosaki, T., Kiuchi, K., Kawaguchi, Y. (1998):

Dopamine D1-like receptor activation excites striatal large aspiny neurons in vitro. *J Neurosci* 18: 5180-5190.

Apicella, P. (2007):

Leading tonically active neurons of the striatum from reward detection to context recognition. *Trends Neurosci* 30 (6): 299-306.

Argyelan, M., Carbon, M., Niethammer, M., Ulug, A. M., Voss, H., Bressman, S. B., Dhawan, V., Eidelberg, D. (2009):

Cerebellothalamocortical connectivity regulates penetrance in dystonia. *J Neurosci* 29: 9740-9747.

Armstrong, D. M., Saper, C. B., Levey, A. I., Wainer, B. H., Terry, R. D. (1983):

Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J Comp Neurol* 216: 53-68.

Augood S.J. Hollingsworth, Z., Albers, D. S., Yang, L., Leung, J., Breakefield, X. O., Standaert, D. G. (2004):

Dopamine transmission in DYT1 dystonia. *Adv Neurol* 94: 53-60.

Augood, S. J., Hollingsworth, Z., Albers, D. S., Yang, L., Leung, J. C., Muller, B., Klein, C., Breakefield, X. O., Standaert, D. G. (2002):

Dopamine transmission in DYT1 dystonia: a biochemical and autoradiographical study. *Neurology* 59 (3): 445-448.

Augood, S. J., Martin, D. M., Ozelius, L. J., Breakefield, X. O., Penney Jr., J. B., Standaert, D. G. (1999):

Distribution of the mRNAs encoding torsinA and torsinB in the normal adult human brain. *Ann Neurol* 46: 761-769.

Augood, S. J., Penney Jr., J. B., Friberg, I. K., Breakefield, X. O., Young, A. B., Ozelius, L. J., Standaert, D. G. (1998):

Expression of the early-onset torsion dystonia gene (DYT1) in human brain. Ann Neurol 43: 669-673.

Badamchian, M., Morrow, K. J. Jr., Carroll, P. T. (1986):

Immunological, isoelectric, hydrophobic and molecular weight differences between soluble and ionically membrane-bound fractions of choline-o-acetyltransferase prepared from mouse and rat brain.

Neurochem Int 9 (3): 409-421.

Bailey, K. R., Rustay, N. R., Crawley, J. N. (2006):

Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: practical concerns and potential pitfalls.

llar J 47 (2): 124-131.

Balcioglu, A., Kim, M. O., Sharma, N., Cha, J. H., Breakefield, X. O., Standaert, D. G. (2007):

Dopamine release is impaired in a mouse model of DYT1 dystonia. *J Neurochem* 102: 783-788.

Baldwin, J.M. (1994):

Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6: 180-190.

Bao, L., Patel, J. C., Walker, R. H., Shashidharan, P., Rice, M. E. (2010):

Dysregulation of striatal dopamine release in a mouse model of dystonia. *J Neurochem* 114 (6): 1781-1791.

Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J. N., Ried, T., Tagle, D., Wynshaw-Boris, A. (1996): Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86: 159-171.

Barrett, M. J. und Bressman, S. (2011):

Genetics and pharmacological treatment of dystonia. *Int Rev Neurobiol* 98: 525-549.

Bateman, D. N., Rawlins, M. D., Simpson, J. M. (1985):

Extrapyramidal reactions with metoclopramide. *Br Med J* (Clin Res Ed) 291: 930-932.

Bennay, M., Gernert, M., Richter, A. (2001):

Spontaneous remission of paroxysmal dystonia coincides with normalization of entopeduncular activity in dt^{sz} mutants. *J Neurosci* 21 (13): RC153.

Bennett, B. D. und Wilson, C. J. (1999):

Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro. *J Neurosci* 19 (13): 5586-5596.

Bertrand, C. M. (1993):

Selective peripheral denervation for spasmodic torticollis: surgical technique, results, and observations in 260 cases. *Surg Neurol* 40 (2): 96-103.

Betz, A. J., McLaughlin, P. J., Burgos, M., Weber, S. M., Salamone, J. D. (2007):

The muscarinic receptor antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movements in a rodent model of parkinsonian tremor: possible role of M4 receptors. *Psychopharmacology* (Berl). 194: 347-359.

Bhatia, K. P. (2001):

Familial (idiopathic) paroxysmal dyskinesias: an update. *Semin Neurol* 21 (1): 69-74.

Bhatia K. P. und Marsden, C. D. (1994):

The behavioural and motor consequences of focal lesions of the basal ganglia in man. *Brain* 117 (Pt 4): 859-876.

Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J., Steinlein, O. K. (1998):

A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279 (5349): 403-406.

Birdsall, N. J., Lazareno, S., Popham, A., Saldanha, J. (2001):

Multiple allosteric sites on muscarinic receptors. *Life Sci* 68: 2517-2524.

Bolam, J. P. und Bennett, B. D. (1995):

Microcircuitry of the neostriatum. In Molecular and Cellular Mechanisms of Neostriatal Function. Edited by Ariano MA, Surmeier DJ. Austin: RG Landes Company. – S. 1-20.

Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A., Bevan, M. D. (2000):

Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat.* 196 (Pt 4): 527-542.

Bolivar, V. J., Caldarone, B. J., Reilly, A. A., Flaherty, L. (2000):

Habituation of activity in an open field: A survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behav Genet* 30 (4): 285-293

Bonsi, P., Cuomo, D. Martella, G., Madeo, G., Schirinzi, T., Puglisi, F., Ponterio, G., Pisani, A. (2011):

Centrality of striatal cholinergic transmission in Basal Ganglia function. *Front Neuroanat* 5: 6.

Bonsi, P., Martella, G., Cuomo, D., Platania, P., Sciamanna, G., Bernardi, G., Wess, J., Pisani, A. (2008):

Loss of muscarinic autoreceptor function impairs long-term depression but not long-term potentiation in the striatum.

J Neurosci 28 (24): 6258-6263.

Brady, A. E., Jones, C. K., Bridges, T. M., Kennedy, J. P., Thompson, A. D., Heiman, J. U., Breininger, M. L., Gentry, P. R., Yin, H., Jadhav, S. B., Shirey, J. K., Conn, P. J., Lindsley, C. W. (2008):

Centrally active allosteric potentiators of the M4 muscarinic acetylcholine receptor reverse amphetamine-induced hyperlocomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 327 (3): 941-953.

Bragg, D. C., Armata, I. A., Nery, F. C., Breakefield, X. O., Sharma, N. (2011): Molecular pathways in dystonia. *Neurobiol Dis* 42: 136–147.

Brans, J. W., Lindeboom, R., Snoek, J. W., Zwarts, M. J., van Weerdenm T. W., Brunt, E. R., van Hilten, J. J., van der Kamp, W., Prins, M. H., Speelman, J. D. (1996): Botulinum toxin versus trihexyphenidyl in cervical dystonia: a prospective, randomized, double-blind controlled trial. *Neurology* 46 (4): 1066-1072.

Breakefield, X.O., Blood, A.J., Li, Y., Hallett, M., Hanson, P.I., Standaert, D.G. (2008): The pathophysiological basis of dystonias. *Nat Rev Neurosci* 9: 222-234.

Breakefield, X. O., Kamm, C., Hanson, P. I. (2001):

TorsinA: movement at many levels. *Neuron* 31 (1): 9-12.

Bressman, S. B. (2004): Dystonia genotypes, phenotypes, and classification. *Adv Neurol* 94: 101-107.

Bressman, S. B., Sabatti, C., Raymond, D., de Leon, D., Klein, C., Kramer, P. L., Brin, M. F., Fahn, S., Breakefield, X., Ozelius, L. J. und Risch, N. J. (2000): The DYT1 phenotype and guidelines for diagnostic testing. *Neurology* 54 (9):1746-1752.

Bressman, S. B. und Greene, P. E. (2000):

Dystonia. *Curr Treat Options Neurol* 2 (3): 275-285.

Brin, M. F., Comella, C. M., Jankovic, J., Naumann, M. (2008): Long-term treatment with botulinum toxin type A in cervical dystonie has low immunogenicity by mouse protection assay. *Mov Disord* 23 (10): 1353-1360.

Bruno, M.K., Hallett, M., Gwinn-Hardy, K., Sorensen, B., Considine, E., Tucker, S., Lynch, D. R., Mathews, K. D., Swoboda, K. J., Harris, J., Soong, B. W., Ashizawa, T., Jankovic, J., Renner, D., Fu, Y. H., Ptacek, L. J. (2004): Clinical evaluation of idiopathic paroxysmal kinesigenic dyskinesia: new diagnostic criteria. *Neurology* 63: 2280-2287.

Buckley, N. J. und Burnstock, G. (1986):

Autoradiographic localization of peripheral M1 muscarinic receptors using [³H]pirenzepine. *Brain Res* 375 (1): 83-91.

Bulloch, K., Damavandy, T., Badamchian, M. (1994):

Characterization of choline O-acetyltransferase (ChAT) in the BALB/C mouse spleen. *Int J Neurosci* 76 (1-2): 141-149.

Burgunder, J., Richter, A., Löscher, W. (1999):

Expression of cholecystokinin, somatostatin, thyrotropin-releasing hormone, glutamic acid decarboxylase and tyrosine hydroxylase genes in the central nervous motor systems of the genetically dystonic hamster.

Exp Brain Res 129 (1): 114-120.

Burke R.E., Fahn S., Marsden C.D. (1986):

Torsion Dystonia: a double-blind, prospective trial of high-dosage trihexyphenidyl. *Neurology* 36: 160-164.

Burke, R. E., Fahn, S., Jankovic, J., Marsden, C. D., Lang, A. E., Gollomp, S., Ilson, J. (1982):

Tardive dystonia: late-onset and persistent dystonia caused by antipsychotic drugs. *Neurology* 32: 1335-1346.

Burke, R. E., Reches, A., Traub, M. M., Ilson, J., Swash, M., Fahn, S. (1985):

Tetrabenazine induces acute dystonic reactions. *Ann Neurol* 17: 200-202.

Butcher, L. L. und Woolf, N. J. (2004):

Cholinergic neurons and networks revisited. In: Paxinos G, editor. The rat central nervous system. 3rd ed. San Diego: *Elsevier Academic Press. – S.* 1257-1268.

Byl, N. N., Merzenich, M. M., Jenkins, W. M. (1996):

A primate genesis model of focal dystonia and repetitive strain injury .1. Learning-induced dedifferentiation of the representation of the hand in the primary somatosensory cortex in adult monkeys.

Neurology 47: 508-520.

Bymaster, F. P., McKinzie, D. L., Felder, C. C. & Wess, J. (2003):

Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochem Res* 28: 437-442.

Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., Bernardi, G. (2000):

Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 23: 120-126.

Calabresi, P., Centonze, D., Pisani, A., Sancesario, G., North, R. A., Bernardi, G. (1998): Muscarinic IPSPs in rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol* 510: 421-427.

Carbon, M., Niethammer, M., Peng, S., Raymond, D., Dhawan, V., Chaly, T., Ma, Y., Bressman, S., Eidelberg, D. (2009):

Abnormal striatal and thalamic dopamine neurotransmission: Genotype-related features of dystonia.

Neurology 72: 2097-2103.

Carmine, A. A. und Brogden, R. N. (1985):

Pirenzepine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in peptic ulcer disease and other allied diseases. *Drugs* 30: 85-126.

Casey, D. E. (2004):

Pathophysiology of antipsychotic drug-induced movement disorders. *J Clin Psychiatry* 65 (9): 25-28.

Caulfield, M. P. (1993):

Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58 (3): 319-379.

Caulfield, M. P. und Birdsall, N. J. (1998):

International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors.

Pharmacol Rev 50: 279-290.

Chan, W. Y., McKinzie, D. L., Bose, S., Mitchell, S. N., Witkin, J. M., Thompson, R. C., Christopoulos, A., Lazareno, S., Birdsall, N. J., Bymaster, F. P., Felder, C. C. (2008): Allosteric modulation of the muscarinic M4 receptor as an approach to treating schizophrenia.

Proc Natl Acad Sci U S A 105 (31): 10978-10983.

Chang, H. T. und Kita, H. (1992):

Interneurons in the rat striatum: relationships between parvalbumin neurons and cholinergic neurons.

Brain Res 574: 307-311.

Chang, H. T., Rumbeiha, W. K., Patterson, J. S., Puschner, B., Knight, A. P. (2011):

Toxic Equine Parkinsonism: An Immunohistochemical Study of 10 Horses With Nigropallidal Encephalomalacia.

Vet Pathol 49 (2): 398-402.

Changeux, J.-P. (2010):

Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nature Reviews Neuroscience* 11: 389-401.

Changeux, J.-P. und Edelstein, S. J. (2005):

Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Molecular Biology to Cognition. Editions Odile Jacob, Johns Hopkins University Press. New York, 2005.

Charlier, C., Coppieters, W., Rollin, F., Desmecht, D., Agerholm, J. S., Cambisano, N., Carta, E., Dardano, S., Dive, M., Fasquelle, C., Frennet, J. C., Hanset, R., Hubin, X., Jorgensen, C., Karim, L., Kent, M., Harvey, K., Pearce, B. R., Simon, P., Tama, N., Nie, H., Vandeputte, S., Lien, S., Longeri, M., Fredholm, M., Harvey, R. J., Georges, M. (2008):

Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock.

Nature Genetics 40 (4): 449-454.

Chiken, S., Shashidharan, P., Nambu, A. (2008):

Cortically evoked long-lasting inhibition of pallidal neurons in a transgenic mouse model of dystonia.

J Neurosci 28 (51): 13967-13977.

Clemmons, R. M., Peters, R. I., Meyers, K. M. (1980):

Scotty cramp: A Review of cause, characteristics, diagnosis and treatment. *Comp Cont Educ* II (5): 385-390.

Colotla, V.A., Flores, E., Oscos, A. Meneses, A., Tapia, R. (1990):

Effects of MPTP on locomotor activity in mice. *Neurotoxicol Teratol* 12 (4): 405-407.

Conn, P. J., Jones, C. K., Lindsley, C. W. (2009):

Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders.

Trends Pharmacol Sci 30 (3): 148-155.

Conrad, B. (1996):

Phänomenologie der Bewegungsstörung. In: Conrad, B., Ceballos-Baumann, A. (eds): Bewegungsstörungen in der Neurologie. Thieme, Stuttgart. - S.1-10.

Contant, C., Umbriaco, D., Garcia, S., Watkins, K. C., Descarries, L. (1996):

Ultrastructural characterization of the acetylcholine innervations in adult rat neostriatum. *Neuroscience* 71: 937-947.

Crawley, J. N. (1999):

Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res* 835 (1): 18-26.

Crawley, J. N. (2000):

What's Wrong with My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice. Wiley, New York, 2000.

Cuny, E., Ghorayeb, I., Guehl, D., Escola, L., Bioulac, B., Burbaud, P. (2008):

Sensory motor mismatch within the supplementary motor area in the dystonic monkey. *Neurobiol Dis* 30 (2): 151-161.

Curra, A., Trompetto, C., Abruzzese, G., Berardelli, A. (2004):

Central effects of botulinum toxin type A: evidence and supposition. *Mov Disord* 19: 60-64.

Dale, D. (1914):

Hydrogen ion concentrations limiting automaticity in different regions of the frog's heart. *J Physiol* 47 (6): 493-508.

Damsma, G., de Boer, P., Westerink, B. H., Fibiger, H. C. (1990):

Dopaminergic regulation of striatal cholinergic interneurons: an in vivo microdialysis study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 342 (5): 523-527.

Dang, M. T., Yokoi, F., McNaught, K. S., Jengelley, T. A., Jackson, T., Li, J. und Li, Y. (2005):

Generation and characterization of Dyt1 DeltaGAG knock-in mouse as a model for early onset dystonia.

Exp Neurol 196: 452-463.

Dani, J. A. (2001):

Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 49: 166-174.

Dani, J. A. und Bertrand, D. (2007):

Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 47: 699-729.

De Amici, M., Dallanoce, C., Holzgrabe, U., Tränkle, C., Mohr, K. (2010):

Allosteric ligands for G protein-coupled receptors: a novel strategy with attractive therapeutic opportunities.

Med Res Rev 30 (3): 463-549.

DeBoer, P., Heeringa, M. J., Abercrombie, E. D. (1996):

Spontaneous release of acetylcholine in striatum is preferentially regulated by inhibitory dopamine D2 receptors.

Eur J Pharmacol 317: 257-262.

Defazio, G. (2010):

The epidemiology of primary dystonia: current evidence and perspectives. *Eur J Neurol* 17 (1): 9-14.

Defazio, G., Berardelli, A. und Hallett, M. (2007):

Do primary adult-onset focal dystonias share aetiological factors? *Brain* 130: 1183-1193.

Delmaire, C., Vidailhet, M., Wassermann, D., Descoteaux, M., Valabregue, R., Bourdain, F., Lenglet, C., Sangla, S., Terrier, A., Deriche, R., Lehéricy, S. (2009):

Diffusion abnormalities in the primary sensorimotor pathways in writer's cramp. *Arch Neurol* 66: 502-508.

Demirkiran, M. und Jankovic, J. (1995):

Paroxysmal dyskinesias: clinical features and classification. *Ann Neurol* 38: 571-579.

Dennis-Sykes, C. A., Miller, W. J., McAleer, W. J. (1985):

A quantitative Western Blot method for protein measurement. *J Biol Stand* 13 (4): 309-314.

De Matos Silva, L. F., de Paula Ramos, E. R., Ambiel, C. R., Correia-de-Sá, P., Alves-Do-Prado, W. (2010):

Apamin reduces neuromuscular transmission by activating inhibitory muscarinic M(2) receptors on motor nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 626 (2-3): 239-243.

De Repentigny, Y., Deschenes-Furry, J., Jasmin, B. J., Kothary, R. (2003):

Impaired fast axonal transport in neurons of the sciatic nerves from dystonia musculorum mice.

J Neurochem 86 (3): 564-571.

Descarries, L., Gisiger, V., Steriade, M. (1997):

Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol* 53: 603-625.

Deutsche Gesellschaft der Neurologie (2008):

"Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie".

Herausgegeben von der Kommission "Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie"; 4. überarbeitete Auflage, Thieme Verlag.

Digby, G. J., Shirey, J. K., Conn, P. J. (2010):

Allosteric activators of muscarinic receptors as novel approaches for treatment of CNS disorders.

Mol BioSyst 6: 1345-1354.

Ding, J., Guzman, J. N., Tkatch, T., Chen, S., Goldberg, J. A., Ebert, P. J., Levitt, P., Wilson, C. J., Hamm, H. E., Surmeier, D. J. (2006):

RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion.

Nat Neurosci 9: 832-842.

Ding, Y., Won, L., Britt, J. P., Lim, S. A., McGehee, D. S., Kang, U. J. (2011):

Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice.

Proc Natl Acad Sci U S A 108 (2): 840-845.

Dittmer, A. und Dittmer, J. (2006):

Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* 27 (14): 2844-2845.

Dörje, F., Levey, A. I., Brann, M. R., (1991):

Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m1-m5) in rabbit peripheral tissues.

Mol Pharmacol 40: 459-462.

Draganski, B., Thun-Hohenstein, C., Bogdahn, U., Winkler, J., May, A. (2003):

"Motor circuit" gray matter changes in idiopathic cervical dystonia. *Neurology* 61 (9): 1228-1231.

Duchen, L. W., Strich, S. J. und Falconer, D. S. (1964):

Clinical and pathological studies of an hereditary neuropathy in mice (Dystonia Musculorum). *Brain* 87: 367-378.

Dudel, J. (2007):

The time course of transmitter release in mouse motor nerve terminals is differentially affected by activation of muscarinic M1 or M2 receptors. *Eur J Neurosci* 26 (8): 2160-2168.

Dunnett, S. B., Pask, T., Brooks, S., Bensadoun, J.-C. (2003):

Assessment of Motor Impairments in Transgenic Mice. In: Mouse Behavioral Phenotyping. / J. N. Crawley (Hrsg.). Washington, DC: Society for Neuroscience. - S. 1-55.

Duttaroy, A., Gomeza., J., Gan, J. W., Siddiqui, N., Basile, A. S., Harman, W. D., Smith, P. L., Felder, C. C., Levey, A. I, Wess, J. (2002):

Evaluation of muscarinic agonistinduced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice.

Mol Pharmacol 62: 1084-1093.

Duvoisin, R. (1967):

Cholinergic-dopaminergic antagonism in parkinsonism. *Arch Neurol* 17: 124-136.

Ebert, U., Gernert, M., Löscher, W., Richter, A. (1996):

Abnormal c-fos expression in the lateral habenula during dystonic attacks in a hamster model of idiopathic dystonia.

Brain Res 728 (1): 125-129.

Eckenstein, F. und Thoenen, H. (1982):

Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. *EMBO J* 1: 363-368.

Edwards, M., Wood, N., Bhatia, K. (2003):

Unusual phenotypes in DYT1 dystonia: a report of five cases and a review of the literature. *Mov Disord* 18: 706-711.

Ellis, J., Seidenberg, M., Brann, M. R. (1993):

Use of chimeric muscarinic receptors to investigate epitopes involved in allosteric interactions.

Mol Pharmacol 44: 583-588.

Everitt, B. J. und Robbins, T. W. (1997):

Central cholinergic systems and cognition. Annu Rev *Psychol* 48: 649-684.

Factor, S. A. und Matthews, M. K. (1991):

Persistent extrapyramidal syndrome with dystonia and rigidity caused by combined metoclopramide and prochlorperazine therapy. *South Med J* 84: 626-628.

Fahn, S. (1994):

Paroxysmal dyskinesias. In: Marsden CD, Fahn S, eds. Movement disorders 3. Oxford: Butterworth-Heinemann. - S. 310-345.

Fahn, S. (1988):

Concept and classification of dystonia. *Adv Neurol* 50: 1-8.

Fahn, S., Bressman, S.B., Marsden, C.D. (1998):

Classification of dystonia. *Adv Neurol* 78: 1-10.

Fahn, S., Marsden, C. D., Calne, D. B. (1987):

Classification and investigation of dystonia. In Marsden CD, Fahn, S. (eds.): Movement disorders. London, Butterworths. - S. 332-358.

Fernagut, P. O., Diguet, E., Labattu, B., Tison, F. (2002):

A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice. *J Neurosci Methods* 113 (2): 123-130.

Fink JW, Rainer S, Wilkowski J Sandra M. Jones, Kume, A., Hedera, P., Albin, R., Mathay, J., Girbach, L., Varvil, T., Otterud, B., Leppert, M. (1996):

Paroxysmal dystonic choreoathetosis: tight linkage to chromosome 2q. *Am J Hum Genet* 59: 140-145.

Fisher, J. E. (1986):

Role of endogenous benzodiazepine receptor ligands aberrant neurogenesis producing susceptibility. Ph.D.-Thesis, Emory University, Athens (Gorgia).

Forster, G. L. und Blaha, C. D. (2003):

Pedunculopontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. *Eur J Neurosci* 17: 751-762.

Franklin, K. B. J. und Paxinos, G. (2008):

The mouse brain in stereotaxic coordinates, 3rd edition. *Elsevier*, Amsterdam.

Fredow, G. und Löscher, W. (1991):

Effects of pharmacological manipulation of GABAergic neurotransmission in a new mutant hamster model of paroxysmal dystonia. *Eur J Pharmacol* 192 (2): 207-219.

Galzi, J. L. und J. P. Changeux. (1995):

Neuronal nicotinic receptors: molecular organisation and regulations. *Neuropharmacology* 34: 563-582.

Gambarin, M., Valente, E. M., Liberini, P., Barrano, G., Bonizzato, A., Padovani, A., Moretto, G., Fiorio, M., Dallapiccola, B., Smania, N., Fiaschi, A., Tinazzi, M. (2006):

Atypical phenotypes and clinical variability in a large Italian family with DYT1-primary torsion dystonia.

Mov Disord. 21 (10): 1782-1784.

Gerfen, C. R. (1992):

The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 15: 285-320.

Gerfen, C. R. und Wilson, C. J. (1996):

The basal ganglia. In: Integrated Systems of the CNS, Part III, Handbook of Chemical Neuroanatomy Vol 12. Edited by Swanson LW, Björklund A, Hökfelt T.: Amsterdam, Elsevier Science. - S. 371-468.

Gernert M., Bennay M., Fedrowitz M., Rehders J. H., Richter A. (2002):

Altered discharge pattern of basal ganglia output neurons in an animal model of idiopathic dystonia.

J Neurosci 22: 7244-7253.

Gernert, M., Hamann, M., Bennay, M., Löscher, W., Richter, A. (2000):

Deficit of striatal parvalbumin-reactive GABAergic interneurons and decreased basal ganglia output in a genetic rodent model of idiopathic paroxysmal dystonia. *J Neurosci* 20 (18): 7052-7058.

Gernert, M., Richter, A., Löscher, W. (1999a):

Alterations in spontaneous single unit activity of striatal subdivisions during ontogenesis in mutant dystonic hamsters.

Brain Res 821 (2): 277-285.

Gernert, M., Richter, A., Löscher, W. (1999b):

Subconvulsive dose of pentylenetetrazole increases the firing rate of substantia nigra pars reticulata neurons in dystonic but not in nondystonic hamsters. *Synapse* 33 (4): 259-267.

Geyer, H.L. und Bressman, S.B. (2006):

The diagnosis of dystonia. *Lancet Neurol* 5: 780-790.

Ghilardi, M. F., Carbon, M., Silvestri, G., Dhawan, V., Tagliati, M., Bressman, S., Ghez, C., Eidelberg, D. (2003):

Impaired sequence learning in carriers of the DYT1 dystonia mutation. *Ann Neurol* 54 (1): 102-109.

Giannakopoulou, D., Armata, I., Mitsacos, A., Shashidharan, P., Giompres, P. (2010): Modulation of the basal ganglia dopaminergic system in a transgenic mouse exhibiting dystonia-like features. *J Neural Transm* 117 (12): 1401-1409.

Giles, L. M., Lian, L., Chin, L. S. (2009):

Printor, a novel torsina-interacting protein implicated in dystonia pathogenesis. *J Biol Chem* 284 (32): 21765-21775.

Goetz, C. G., Chmura, T. A., Lanska, D. J. (2001):

History of dystonia: part 4 of the MDS-sponsored history of movement disorders exhibit, Barcelona, June, 2000. *Mov Disord* 16 (2): 339-345.

Gomeza, J., Zhang, L., Kostenis, K., Felder, C., Bymaster, F., Brodkin, J., Shannon, H., Xia, B., Deng, C., Wess, J. (1999):

Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M4 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10483-10488.

Gonzalez-Alegre, P. und Paulson, H. L. (2004):

Aberrant cellular behavior of mutant torsinA implicates nuclear envelope dysfunction in DYT1 dystonia.

J Neurosci 24: 2593-2601.

Goodchild, R. E. und Dauer, W. T. (2005):

The AAA+ protein torsinA interacts with a conserved domain present in LAP1 and a novel ER protein.

J Cell Biol 168: 855-862.

Goodchild, R. E. und Dauer, W. T. (2004):

Mislocalization to the nuclear envelope: an effect of the dystonia-causing torsinA mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 847-852.

Goodchild, R. E., Kim, C. E., Dauer, W. T. (2005):

Loss of the dystonia-associated protein torsinA selectively disrupts the neuronal nuclear envelope.

Neuron 48: 923-932.

Granata, A., Watson, R., Collinson, L. M., Schiavo, G., Warner, T. T. (2008):

The dystonia-associated protein torsinA modulates synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem* 283: 7568-7579.

Graveland, G. A., Williams, R. S., DiFiglia, M. (1985a):

Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease.

Science 227: 770-773.

Graveland, G. A., Williams, R. S., DiFiglia, M. (1985b):

A Golgi study of the human neostriatum: neurons and afferent fibers. *J Comp Neurol* 234: 317-333.

Graybiel, A. M. (1990)

Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13: 244-254.

Graybiel, A. M., Aosaki, T., Flaherty, A. W., Kimura, M. (1994):

The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* 265 (5180): 1826-1831.

Greenlee, W., Clader, J., Asberom, T., McCombie, S., Ford, J., Guzik, H., Kozlowski, J., Li, S., Liu, C., Lowe, D., Vice, S., Zhao, H., Zhou, G., Billard, W., Binch, H., Crosby, R., Duffy, R., Lachowicz, J., Coffin, V., Watkins, R., Ruperto, V., Strader, C., Taylor, L., Cox, K. (2001):

Muscarinic agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Farmaco* 56 (4): 247-250.

Gross, R. E. (2008):

What happened to posteroventral pallidotomy for Parkinson's disease and dystonia? *Neurotherapeutics* 5 (2): 281-293.

Gröticke, I., Hoffmann, K., Löscher, W. (2007):

Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp Neurol* 207 (2): 329-349.

Grundmann, K., Reischmann, B., Vanhoutte, G., Hübener, J., Teismann, P., Hauser, T.K., Bonin, M., Wilbertz, J., Horn, S., Nguyen, H. P., Kuhn, M., Chanarat, S., Wolburg, H., Van der Linden, A., Riess, O. (2007):

Overexpression of human wildtype torsinA and human DeltaGAG torsinA in a transgenic mouse model causes phenotypic abnormalities. *Neurobiol Dis* 27 (2): 190-206.

Hallett, M. (2004):

Dystonia: abnormal movements result from loss of inhibition. *Adv Neurol* 94: 1-9.

Hallett, M. (2011):

Neurophysiology of Dystonia: The Role of Inhibition. *Neurobiol Dis* 42 (2): 177-184.

Hamann, M. (2000):

Pharmakologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Bedeutung striataler Fehlfunktionen des GABAergen Systems in einem genetischen Tiermodell für die primäre paroxysmale Dystonie. Dissertationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Hamann, M., Lange, N., Kuschka, J., Richter, A. (2010):

Non-invasive genotyping of transgenic mice: comparison of different commercial kits and required amounts.

ALTEX 27 (3): 185-190.

Hamann, M., Raymond, R., Varughesi, S., Nobrega, J. N., Richter, A. (2006):

Acetylcholine receptor binding and cholinergic interneuron density are unaltered in a genetic animal model of primary paroxysmal dystonia. *Brain Res* 1099 (1): 176-182.

Hamann, M. und Richter, A. (2002):

Effects of striatal injections of GABA(A) receptor agonists and antagonists in a genetic animal model of paroxysmal dystonia. *Eur J Pharmacol* 443: 59-70.

Hamann, M. und Richter, A. (2004):

Striatal increase of extracellular dopamine levels during dystonic episodes in a genetic model of paroxysmal dyskinesia.

Neurobiol Dis 16: 78-84.

Hamann, M., Richter, A., Fink, H., Rex, A. (2009):

Altered nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) fluorescence in *dt*^{sz} mutant hamsters reflects differences in striatal metabolism between severe and mild dystonia. *J Neurosci Res* 87 (3): 776-783.

Hamann, M., Richter, A., Meillasson, F. V., Nitsch, C., Ebert, U. (2007):

Age-related changes in parvalbumin-positive interneurons in the striatum, but not in the sensorimotor cortex in dystonic brains of the dt(sz) mutant hamster. Brain Res 1150: 190-199.

Hamann, M., Sander, S. E., Richter, A. (2005):

Age-dependent alterations of striatal calretinin interneuron density in a genetic animal model of primary paroxysmal dystonia. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 776-781.

Hamann, M., Sander S. E., Richter, A. (2008):

Effects of repeated neurosteroid applications on the age-dependent time-course of dystonia in the dt^{sz} hamster.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 377 (Suppl 1): 233.

Hammer, R. und Koss, F. W. (1979):

The pharmacokinetic profile of pirenzepine. *Scand J Gastroenterol* 14 (57): 1-6.

Hammer, R., Berrie, C. P., Birdsall, N. J., Burgen, A. S., Hulme, E. C. (1980):

Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 293: 90-92.

Hanslick, J. L., Lau, K., Noguchi, K. K., Olney, J. W., Zorumski, C. F., Mennerick, S., Farber, N. B. (2009):

Dimethyl Sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system.

Neurobiol Dis 34 (1): 1-10.

Harnack, D., Hamann, M., Meissner, W., Morgenstern, R., Kupsch, A., Richter, A. (2004):

High-frequency stimulation of the entopeduncular nucleus improves dystonia in dt(sz)hamsters.

Neuroreport 15 (9): 1391-1393.

Harvey, R. J., Topf, M., Harvey, K., Rees, M. I. (2008):

The genetics of hyperekplexia: more than startle! *Trends Genet* 24 (9): 439-447.

Herrero, M. T., Barcia, C., Navarro, J. M. (2002):

Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst* 18 (8): 386-404.

Hersch, S. M., Gutekunst, C. A., Rees, H. D., Heilman, C. J., Levey, A. I. (1994): Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 5 (2): 3351-3363.

Hewett J., Gonzalez-Agosti, C., Slater, D., Ziefer, P., Li, S., Bergeron, D., Jacoby, D. J., Ozelius, L. J., Ramesh, V., Breakefield, X. O. (2000):

Mutant torsinA, responsible for early-onset torsiondystonia, forms membrane inclusions in cultured neural cells.

Hum Mol Genet 9: 1403-1413.

Hewett, J., Johanson, P., Sharma, N., Standaert, D., Balcioglu, A. (2010):

Function of dopamine transporter is compromised in DYT1 transgenic animal model in vivo. *J Neurochem* 113: 228-235.

Hewett, J. W., Nery, F. C., Niland, B., Ge, P., Tan, P., Hadwiger, P., Tannous, B. A., Sah, D. W., Breakefield, X. O. (2008):

siRNA knock-down of mutant torsinA restores processing through secretory pathway in DYT1 dystonia cells.

Hum Mol Genet 17: 1436-1445.

Hewett, J. W., Tannous, B., Niland, B. P., Nery, F. C., Breakefield, X. O. (2007):

Mutant torsinA interferes with protein processing through the secretory pathway in DYT1 dystonia cells.

Proc Natl Acad Sci USA 104: 7271-7276.

Hewett, J. W., Zeng, J., Niland, B. P., Bragg, D. C., Breakefield, X. O. (2006):

Dystonia-causing mutant torsinA inhibits cell adhesion and neurite extension through interference with cytoskeletal dynamics. *Neurobiol Dis* 22: 98-111.

Howatt I Ziafor P Borgoron D Naismith

Hewett, J., Ziefer, P., Bergeron, D., Naismith, T., Boston, H., Slater, D., Wilbur, J., Schuback, D., Kamm, C., Smith, N., Camp, S., Ozelius, L. J., Ramesh, V., Hanson, P. I., Breakefield, X. O. (2003):

TorsinA in PC12 cells: localization in the endoplasmic reticulum and response to stress. *J Neurosci Res* 72: 158-168.

Hogg, R. C., Raggenbass, M., Bertrand, D. (2003):

Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 147: 1-46.

Hornykiewicz, O. und Kish, S.J. (1987):

Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 45: 19-34.

Houser, C. R., Crawford, G. D., Barber, R. P., Salvaterra, P. M., Vaughn, J. E. (1983):

Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res* 266 (1): 97-119.

Huang, L. Z., Grady, S. R., Quik, M. (2011):

Nicotine reduces L-Dopa-induced dyskinesias by acting at beta2 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 338: 932-941.

Hulme, E. C., Birdsall, N. J., Buckley, N. J. (1990):

Muscarinic receptor subtypes. Annu Rev Pharmacol Toxicol 30: 633-673.

Hulme, E. C., Lu, Z. L., Saldanha, J. W., Bee, M. S. (2003):

Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* 31(1): 29-34.

Ibáñez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Unal, B., Shah, F., Koós, T., Tepper, J. M. (2010): Electrophysiological and morphological characteristics and synaptic connectivity of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in adult mouse striatum. *J Neurosci* 30 (20): 6999-7016.

Ichinose, H., Ohye, T., Takayashi, E., Seki, N., Hori, T., Segawa, M., Nomura, Y., Endo, K., Tanaka, H., Tsuji, S. (1994):

Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene.

Nat Genet 8: 236-242.

Ikeda, M., Mikuni, M., Nishikawa, T., Takahashi, K. (1989):

A neurochemical study of a new mutant mouse presenting myoclonus-like involuntary movement: a possible model of spontaneous serotonergic hyperactivity. *Brain Res* 495 (2): 337-348.

Ikoma, K., Samii, A., Mercuri, B., Wassermann, E. M., Hallett, M. (1996): Abnormal cortical motor excitability in dystonia. *Neurology* 46: 1371-1376.

Imperato, A., Obinu, M.C., Gessa, G. L. (1993):

Stimulation of both dopamine D1 and D2 receptors facilitates in vivo acetylcholine release in the hippocampus.

Brain Res 618: 341-345.

Ince, E., Ciliax, B. J., Levey, A. I. (1997):

Differential expression of D1 and D2 dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *Synapse* 27: 357-366.

Jamal, M., Ameno, K., Miki, T., Wang, W., Kumihashi, M., Isse, T., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakayama, K., Ijiri, I., Kinoshita, H. (2009):

Cholinergic alterations following alcohol exposure in the frontal cortex of Aldh2-deficient mice models.

Brain Res. 1295: 37-43.

Jankovic, J. (2006):

Treatment of dystonia. *Lancet Neurol* 5: 864-872.

Jankovic, J. (2009):

Treatment of hyperkinetic movement disorders. *Lancet Neurol* 8: 844-856.

Jankovic, J. und Tintner, R. (2001):

Dystonia and parkinsonism. Parkinsonism Relat Disord 8 (2): 109-121.

Jankovic, J., Vuong, K. D., Ahsan J. (2003):

Comparison of efficacy and immunogenicity of original versus current botulinum toxin in cervical dystonia.

Neurology 60: 1186-1188.

Jakubík, J., Bacáková, L., El-Fakahany, E. E., Tucek, S. (1997):

Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors.

Mol Pharmacol 52 (1): 172-179.

Jenner, P. (2000):

Pathophysiology and biochemistry of dyskinesia: clues for the development of nondopaminergic treatments. *J Neurol* 247 (2): II43-50.

Jiao, Y., Yan, J., Zhao, Y., Donahue, L. R., Beamer, W. G., Li, X., Roe, B. A., Ledoux, M. S., Gu, W. (2005):

Carbonic anhydrase-related protein VIII deficiency is associated with a distinctive lifelong gait disorder in waddles mice.

Genetics 171: 1239-1246.

Jin, X. und Costa, R. M. (2010):

Start/stop signals emerge in nigrostriatal circuits during sequence learning. *Nature* 466 (7305): 457-462.

Jinnah, H. A. und Hess, E. J. (2008):

Experimental therapeutics for dystonia. *Neurotherapeutics* 5 (2): 198-209.

Jinnah, H. A., Hess, E. J., Ledoux, M. S., Sharma, N., Baxter, M. G., Delong, M. R. (2005):

Rodent models for dystonia research: characteristics, evaluation, and utility. *Mov Disord* 20 (3): 283-292.

Jinnah, H. A., Richter, A., Mink, J. W., Caldwell, G. A., Caldwell, K. A., Gonzalez-Alegre, P., Cookson, M. R., Breakefield, X. O., Delong, M. R., Hess, E. J. (2008):

Animal models for drug discovery in dystonia. Expert Opinion on Drug Discovery 3 (1): 83-97.

Jones, S., Sudweeks, S., Yakel, J. L. (1999):

Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci* 22: 555-561.

Kamm, C. (2009):

Genetics of dystonia. Fortschr Neurol Psychiatr 77 (1): 32-36.

Kamm, C., Boston, H., Hewett, J., Wilbur, J., Corey, D. P., Hanson, P. I., Ramesh, V., Breakefield, X. O. (2004):

The early onset dystonia protein torsinA interacts with kinesin light chain 1. *J Biol Chem* 279: 19882-19892.

Kang, U. J., Burke, R. E., Fahn, S. (1988): Tardive dystonia. *Adv Neurol* 50: 415-429.

Karasawa, H., Taketo, M. M., Matsui, M.(2003):

Loss of anti-cataleptic effect of scopolamine in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor subtype 4. *Eur J Pharmacol* 468: 15-19.

Karl, T., Pabst, R., von Horsten, S. (2003):

Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol* 55 (1): 69-83.

Karlin, A. (2002):

Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3: 102-114.

Kawaguchi, Y. (1993):

Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13 (11): 4908-4923.

J Neurosci 13 (11): 4908-4923.

Kawaguchi, Y., Aosaki, T., Kubota, Y. (1997):

Cholinergic and GABAergic interneurons in the striatum. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 17 (2): 87-90.

Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., Emson, P. C. (1995):

Striatal interneurones: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18 (12): 527-535.

Kemp, J. M. und Powell, T. P. (1971):

The termination of fibres from the cerebral cortex and thalamus upon dendritic spines in the caudate nucleus: a study with the Golgi method. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* 262: 429-439.

Kertesz, A. (1967):

Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. An entity within the paroxysmal choreoathetosis syndrome. Description of 10 cases, including 1 autopsied. *Neurology* 17 (7): 680-690.

Kimura, H., McGeer, P. L., Peng, J. H., McGeer, E.G. (1981):

The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat.

J Comp Neurol 200: 151-201.

Klein, C., Ozelius, L. J., Breakefield, X. O. (2007):

Genetic evaluation in primary dystonia. In: Handbook of Dystonia, Stacy MA, editor. Taylor & Francis Group, New York, 2007. - S. 21-44.

Köhling, R., Koch, U. R., Hamann, M. und Richter, A. (2004):

Increased excitability in cortico-striatal synaptic pathway in a model of paroxysmal dystonia. *Neurobiol Dis* 16: 236-245.

Köhling R., Koch U., Richter A., Hamann M., Speckmann E.-J. (2003):

Cortico-striatal communication in dystonic dtsz hamster brain slices. *Eur J Physiol* 445: 27.

Konakova, M., Huynh, D. P., Yong, W., Pulst, S. M. (2001):

Cellular distribution of torsin A and torsin B in normal human brain. *Arch Neurol* 58: 921-927.

Koos, T. und Tepper, J. M. (1999):

Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 2 (5): 467-472.

Koos, T. und Tepper, J. M. (2002):

Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J Neurosci* 22 (2): 529-535.

Koos, T., Tepper J. M., Wilson C. J. (2004):

Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J Neurosci* 24 (36): 7916-7922.

Kreitzer, A. C. (2009):

Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci* 32: 127-147.

Kreitzer, A. C. und Malenka, R. C. (2008):

"Striatal plasticity and basal ganglia circuit function." *Neuron* 60 (4): 543-554.

Kuner, R., Teismann, P., Trutzel, A., Naim, J., Richter, A., Schmidt, N., Bach, A., Ferger, B., Schneider, A. (2004):

TorsinA, the gene linked to early-onset dystonia, is upregulated by the dopaminergic toxin MPTP in mice.

Neurosci Lett 355: 126-130.

Kustedjo, K., Deechongkit, S., Kelly, J. W., Cravatt, B. F. (2003):

Recombinant expression, purification, and comparative characterization of torsinA and its torsion dystonia-associated variant Delta E-torsinA. *Biochemistry* 42 (51):15333-15341.
Lang, A. E. und Lees, A. (2002):

Anticholinergic therapies in the treatment of Parkinson's disease. In: Management of Parkinson's disease: an evidence-based review. *Mov Disord* 17 (4): 7-12.

Lange, N. (2009):

Verhaltensanalytische und pharmakologische Untersuchungen in einem transgenen Mausmodell für die Early-onset-Torsionsdystonie. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin, Berlin.

Lange, N., Hamann, M., Shashidharan, P., Richter, A. (2011):

Behavioural and pharmacological examinations in a transgenic mouse model of early-onset torsion dystonia.

Pharmacol Biochem Behav 97 (4): 647-655.

Langmead, C. J., Watson, J., Reavill, C. (2008):

Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* 117: 232-243.

Lapper, S. R. und Bolam, J. P. (1992):

Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat.

Neuroscience 51 (3): 533-545.

Lazareno, S., Dolezal, V., Popham, A., Birdsall, N. J. (2004):

Thiochrome enhances acetylcholine affinity at muscarinic M4 receptors: receptor subtype selectivity via cooperativity rather than affinity. *Mol Pharmacol* 65 (1): 257-266.

Lazareno, S., Gharagozloo, P., Kuonen, D., Popham, A., Birdsall, N. J. (1998):

Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: radioligand binding studies. *Mol Pharmacol* 53 (3): 573-589.

Lechin, F., van der Dijs, B., Hernández-Adrián, G. (2006):

Dorsal raphe vs. median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: relevance for neuropharmacological therapy.

Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 30 (4): 565-585.

LeDoux, M. S., Hurst, D. C., Lorden, J. F. (1998):

Single-unit activity of cerebellar nuclear cells in the awake genetically dystonic rat. *Neuroscience* 86 (2): 533-545.

LeDoux, M. S., Lorden, J. F., Meinzen-Derr, J. (1995):

Selective elimination of cerebellar output in the genetically dystonic rat. *Brain Res* 697 (1-2): 91-103.

Lee H.Y., Xu Y., Huang Y., Ahn, A.H., Auburger, G.W., Pandolfo, M., Kwiecinski, H., Grimes, D.A., Lang, A.E., Nielsen, J.E., Averyanov, Y., Servidei, S., Friedman, A., Van Bogaert, P., Abramowicz, M. J., Bruno, M. K., Sorensen, B. F., Tang, L., Fu, Y. H., Ptácek, L. J. (2004):

The gene for nonkinesigenic paroxysmal dyskinesia encodes an enzyme in a stress response pathway.

Hum Mol Genet 13: 3161-3170.

Lehéricy, S., Hirsch, E. C., Cervera, P., Hersh, L. B., Hauw, J. J., Ruberg, M., Agid, Y. (1989):

Selective loss of cholinergic neurons in the ventral striatum of patients with Alzheimer disease.

Proc Natl Acad Sci U S A 86 (21): 8580-8584.

Lena, C., Changeux, J. P., Mulle, C. (1993):

Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus.

J Neurosci 13: 2680-2688.

Le Novere, N. und Changeux, J.-P. (1995):

Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells.

Mol Evol 40: 155-172.

Lenz, F. A., Suarez, J. I., Metman, L. V., Reich, S. G., Karp, B. I., Hallett, M., Rowland, L. H., Dougherty, P. M. (1998):

Pallidal activity during dystonia: somatosensory reorganisation and changes with severity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65: 767-770.

Leppik, I. E. (1994):

Antiepileptic drugs in development: prospects for the near future. *Epilepsia* 35 (4): 29-40.

Lester, D. B., Rogers, T. D., Blaha, C. D. (2010):

Acetylcholine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther* 16 (3):137-162.

Levey, A. I. (1996):

Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease.

Proc Natl Acad Sci U S A 93 (24): 13541-13546.

Levey, A. I., Edmunds, S. M., Koliatsos, V., Wiley, R. G., & Heilman, C. J. (1995):

Expression of M1–M4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation.

J Neurosci 15: 4077-4092.

Levey, A. I., Kitt, C. A., Simonds, W. F., Price, D. L., & Brann, M. R. (1991):

Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies.

J Neurosci 11 (10): 3218-3226.

Levy, L. M. und Hallett, M. (2002):

Impaired brain GABA in focal dystonia. *Ann Neurol* 51 (1): 93-101.

Lew, M. F., Brashear, A., Factor, S. (2000):

The safety and efficacy of botulinum toxin type B in the treatment of patients with cervical dystonia: summary of three controlled clinical trials. *Neurology* 55 (12): 29-35.

Liu, J. J., Ding, J., Wu, C., Bhagavatula, P., Cui, B., Chu, S., Mobley, W. C., Yang, Y. (2007):

Retrolinkin, a membrane protein, plays an important role in retrograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci* U S A 104 (7): 2223-2228.

Loewi, O. (1921):

"Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I." *Pflügers Archiv* 189: 239-242.

Lorden, J. F., McKeon, T. W., Baker, H. J., Cox, N., und Walkley, S. U. (1984):

Characterization of the rat mutant dystonic (dt): a new animal model of dystonia musculorum deformans.

J Neurosci 4 (8): 1925-1932.

Löscher, W. (2002):

Pharmakologie des vegetativen (autonomen) Nervensystems. In: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin (2. Auflage). H.H. Frey und W. Löscher. - S 41-50.

Löscher, W. und Hörstermann, D. (1992):

Abnormalities in amino acid neurotransmitters in discrete brain regions of genetically dystonic hamsters.

J Neurochem 59: 689-694.

Löscher, W. und Fredow, G. (1992):

Effects of pharmacological manipulation of dopaminergic and cholinergic neurotransmission in genetically dystonic hamsters. *Eur J Pharmacol* 213 (1): 31-39.

Löscher, W., Blanke, T., Richter, A., Hoppen, H. O. (1995):

Gonadal sex hormones and dystonia: experimental studies in genetically dystonic hamsters. *Mov Disord* 10 (1): 92-102.

Löscher, W., Fisher, J. E., Jr., Schmidt, D., Fredow, G., Honack, D. und Iturrian, W. B. (1989):

The *sz* mutant hamster: a genetic model of epilepsy or of paroxysmal dystonia? *Mov Disord* 4 (3): 219-232.

Lucas-Meunier E., Fossier P., Baux G., Amar M. (2003):

Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. Pflugers Arch - *Eur J Physiol* 446: 17-29.

Lukas, R. J. und Bencherif, M. (1992):

Heterogeneity and regulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Int Rev Neurobiol* 34: 25-131.

Maljevic, S., Wuttke, T. V., Lerche, H. (2008):

Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. *J Physiol* 586 (7): 1791-1801.

Marks, W. J. J. (2007):

Brain surgery for dystonia. In: Handbook of dystonia, Stacy MA, editor. Informa Healtcare USA, Inc.: New York, 2007. - S. 393-406.

Marsden, C. D. und Quinn, N. P. (1990):

The dystonias. *BMJ* 300 (6718): 139-144.

Martella, G., Tassone, A., Sciamanna, G., Platania, P., Cuomo, D., Viscomi, M.T., Bonsi, P., Cacci, E., Biagioni, S., Usiello, A., Bernardi, G., Sharma, N., Standaert, D. G., Pisani, A. (2009):

Impairment of bidirectional synaptic plasticity in the striatum of a mouse model of DYT1 dystonia: role of endogenous acetylcholine. *Brain* 132: 2336-2349.

Martin, J. H. (1991):

Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neurosci Lett* 127 (2): 160-164.

Maskos, U. (2008):

The cholinergic mesopontine tegmentum is a relatively neglected nicotinic master modulator of the dopaminergic system: relevance to drugs of abuse and pathology. *Br J Pharmacol* 153 (1): 438-445.

Matthews, G. G. (2001):

Part III Motor Control System. In: Neurobiology: molecules, cells and systems. Malden, Massachusetts, USA: Blackwell Science, Inc. - S. 137-279.

Maurice, N., Mercer, J., Chan, C. S., Hernandez-Lopez, S., Held, J., Tkatch, T., Surmeier, D. J. (2004):

D2 dopamine receptor-mediated modulation of voltage-dependent Na+ channels reduces autonomous activity in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci 24*: 10289-10301.

May, L. T. und Christopoulos, A. (2003):

Allosteric modulators of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol* 3 (5): 551-556.

McGavern, D. B., Zoecklein, L., Drescher, K. M., Rodriguez, M. (1999):

Quantitative assessment of neurologic deficits in a chronic progressive murine model of CNS demyelination.

Exp Neurol 158: 171-181.

McGehee, D. S. und Role, L. W. (1995):

Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol* 57: 521-546.

McNaught, K. S., Kapustin, A., Jackson, T., Jengelley, T. A., Jnobaptiste, R., Shashidharan, P., Perl, D. P., Pasik, P., Olanow, C. W. (2004): Brainstem pathology in DYT1 primary torsion dystonia. *Ann Neurol* 56: 540-547.

Mehta, S. H., Morgan, J. C., Sethi, K. D. (2009): Paroxysmal dyskinesias. *Curr Treat Options Neurol* 11 (3): 170-178.

Mena-Segovia, J., Sims, H. M., Magill, P. J., Bolam, J. P. (2008):

Cholinergic brainstem neurons modulate cortical gamma activity during slow oscillations. *J Physiol* 586: 2947-2960.

Mesulam, M. M., Mash, D., Hersh, L., Bothwell, M., Geula, C. (1992):

Cholinergic innervation of the human striatum, globus pallidus, subthalamic nucleus, substantia nigra, and red nucleus. *J Comp Neurol* 323 (2): 252-268.

Middleton, F. A. und Strick, P. L. (2000)

Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res Rev.* 31 (2-3): 236-250.

Mink, J. W. (2003):

The basal ganglia and involuntary movements: impaired inhibition of competing motor patterns. *Arch Neurol* 60 (10): 1365-1368.

Mink, J. W. (2007):

Paroxysmal dyskinesias. *Curr Opin Pediatr* 19: 652-656.

Misbahuddin, A., Placzek, M. R., Taanman, J. W., Gschmeissner, S., Schiavo, G., Cooper, J. M., Warner, T. T., (2005):

Mutant torsinA, which causes early-onset primary torsion dystonia, is redistributed to membranous structures enriched in vesicular monoamine transporter in cultured human SH-SY5Y cells.

Mov Disord 20: 432-440.

Morin, L. P. und Wood, R. I. (2001):

A stereotaxic Atlas of The Golden Hamster Brain. San Diego, Academic Press.

Mrzljak, L., Levey, A. I., Goldman-Rakic, P. S. (1993):

Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission.

Proc Natl Acad Sci U S A 90 (11): 5194-5198.

Mullen, G. P., Mathews, E. A., Vu, M. H., Hunter, J. W., Frisby, D. L., Duke, A., Grundahl, K., Osborne, J. D., Crowell, J. A., Rand, J. B. (2007):

Choline transport and de novo choline synthesis support acetylcholine biosynthesis in caenorhabditis elegans cholinergic neurons.

Genetics 177: 195-204.

Müller, R. (2004):

Signaltransduktion des Zytokins Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) im Hoden der Ratte. Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.

Müller, U. (2009):

The monogenic primary dystonias. *Brain* 132: 2005-2025.

Müller, C. J., Gröticke, I., Hoffmann, K., Schughart, K., Löscher, W. (2009):

Differences in sensitivity to the convulsant pilocarpine in substrains and sublines of C57BL/6 mice.

Genes Brain Behav 8 (5): 481-492.

Münchau, A., Palmer, J. D., Dressler, D., O'Sullivan, J. D., Tsang, K. L., Jahanshahi, M., Quinn, N. P., Lees, A. J., Bhatia, K. P. (2001):

Prospective study of selective peripheral denervation for botulinum-toxin resistant patients with cervical dystonia.

Brain 124 (4): 769-783.

Nagatsu, T. und Ichinose, H. (1997):

GTP cyclohydrolase I gene, dystonia, juvenile parkinsonism, and Parkinson's disease. *J Neural Transm* 49: 203-209.

Naismith, T. V., Heuser, J. E., Breakefield, X. O., Hanson, P. I. (2004):

TorsinA in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7612-7617.

Nakano, K. (2000):

Neural circuits and topographic organization of the basal ganglia and related regions. *Brain Dev* 22 (1): 5-16.

Nakano, K., Kayahara, T., Tsutsumi, T., Ushiro, H. (2000):

Neural circuits and functional organization of the striatum. *Neuron* 247 (5): V1-15.

Nardocci, N., Fernandez-Alvarez, E., Wood, N. W., Spacy, S. D., Richter, A. (2002):

The paroxysmal dyskinesias.In: Epilepsy and Movement Disorders. Guerrini, R., Aicardi, J., Andermann, F. and Hallett, M. (eds.). Cambridge, Cambridge Univ. Press. - S. 125-139.

Nastuk, M. A. und Graybiel, A. M. (1988):

Autoradiographic localization and biochemical characteristics of M1 and M2 muscarinic binding sites in the striatum of the cat, money and human. *J Neurosci* 8 (3): 1052-1062.

Naumann, M., Pirker, W., Reiners, K., Lange, K. W., Becker, G., Brucke, T. (1998): Imaging the pre- and postsynaptic side of striatal dopaminergic synapses in idiopathic cervical dystonia: a SPECT study using [123I] epidepride and [123I] beta-CIT. *Mov Disord* 13: 319-323.

Nauta, W. J. und Domesick, V. B. (1984):

Afferent and efferent relationships of the basal ganglia. *Ciba Found Symp* 107: 3-29.

Nery, F. C., Zeng, J., Niland, B. P., Hewett, J., Farley, J., Irimia, D., Li, Y., Wiche, G., Sonnenberg, A., Breakefield, X. O. (2008):

TorsinA binds the KASH domain of nespins and participates in linkage between nuclear envelope and cytoskeleton.

J Cell Sci 121 (20): 3476-3486.

Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., Koonin, E. V. (1999):

AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genomic Res* 9: 27-43.

206

Neychev, V. K., Gross, R. E., Lehéricy, S., Hess, E. J., Jinnah, H. A. (2011): The functional neuroanatomy of dystonia. *Neurobiol Dis* 42: 185-201.

Nobrega, J. N., Gernert, M., Löscher, W., Raymond, R., Belej, T., Richter, A. (1999): Tyrosine hydroxylase immunoreactivity and [3H]WIN 35,428 binding to the dopamine transporter in a hamster model of idiopathic paroxysmal dystonia. *Neuroscience* 92 (1): 211-217.

Nobrega, J. N., Raymond, R., Barlow, K., Hamann, M., Richter, A. (2002): Changes in AMPA receptor binding in an animal model of inborn paroxysmal dystonia. *Exp Neurol* 176: 371-376.

Nobrega, J. N., Richter, A., Jiwa, D., Raymond, R., Löscher, W. (1997): Alterations in N-methyl-D-aspartate receptor binding in dystonic hamster brains. *Brain Res* 744. 161-165.

Nobrega, J. N., Richter, A., Jiwa, D., Raymond, R., Löscher, W. (1998): Regional alterations in neuronal activity in dystonic hamster brain determined by quantitative cytochrome oxidase histochemistry. *Neuroscience* 83 (4): 1215-1223.

Nutt, J. G., Muenter, M. D., Aronson, A., Kurland, L. T., Melton, L. J. (1988): Epidemiology of focal and generalized dystonia in Rochester, Minnesota. *Mov Disord* 3 (3): 188-194.

Nygaard, T. G. (1995):

Dopa-responsive dystonia. *Curr Opin Neurol* 8 (4): 310-313.

Oberlin, S. R., Konakova, M., Pulst, S., Chesselet, M. F. (2004):

Development and anatomic localization of torsinA. *Adv Neurol* 94: 61-65.

Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz, M. C., Rodríguez, M., Lanciego, J. L., Artieda, J., Gonzalo, N., Olanow, C. W. (2000):

Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23 (10): 8-19.

O'Brien, J. A., Lemaire, W., Chen, T. B., Chang, R. S., Jacobson, M. A., Ha, S. N., Lindsley, C. W., Schaffhauser, H. J., Sur, C., Pettibone, D. J., Conn, P. J., Williams, D. L. Jr. (2003):

A family of highly selective allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor subtype 5.

Mol Pharmacol 64 (3): 731-740.

Oda, Y. (1999): Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int* 49 (11): 921-937.

Oliveira, L., Timóteo, M. A., Correia-de-Sá, P. (2002):

Modulation by adenosine of both muscarinic M1-facilitation and M2-inhibition of [3H]acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Eur J Neurosci* 15 (11): 1728-1736.

Oppenheim H. (1911):

Über eine eigenartige Kramotkrankheit des kindlichen und jugendlichen Alters (Dysbasia lordotica progressiva, Dystonia musculorum deformans). *Neurologie Centralblatt* 30: 1090-1107.

Ozelius, L. J., Hewett, J.W., Page, C. E., Bressman, S. B., Kramer, P. L., Shalish, C., de Leon, D., Brin, M. F., Raymond, D., Corey, D. P., Fahn, S., Risch, N. J., Buckler, A. J., Gusella, J. F., Breakefield, X. O. (1997):

The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet* 17: 40-48.

Ozelius, L. J., Hewett, J. W., Page, C. E., Bressman, S. B., Kramer, P. L., Shalish, C., de Leon, D., Brin, M. F., Raymond, D., Jacoby, D., Penney, J., Risch, N. J., Fahn, S., Gusella, J. F., Breakefield, X. O. (1998):

The gene (DYT1) for early-onset torsion dystonia encodes a novel protein related to the Clp protease/heat shock family.

Adv Neurol 78: 93-105.

Ozelius, L. J., Lubarr, N., Bressman, S. B. (2011): Milestones in dystonia. *Mov Disord* 26 (6): 1106-1026.

Packer, R. A., Patterson, E. E., Taylor, J. F., Coates, J. R., Schnabel, R. D., O'Brien, D. P. (2011):

Characterization and mode of inheritance of a paroxysmal dyskinesia in Chinook dogs. *J Vet Intern Med* 24 (6): 1305-1313.

Patel, K., Roskrow, T., Davis, J. S., Heckmatt, J. Z. (1995): Dopa responsive dystonia. *Arch Dis Child* 73: 256-257.

Pavlides, C., Kimura, A., Magarinos, A. M., McEwan, B. S. (1995):

Hippocampal homosynaptic long-term depression/depotentiation induced by adrenal steroids.

Neuroscience 68 (2): 379-385.

Paxinos, G. und Watson, C. (2001):

The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. Academic Press, New York/ London.

Perez-Rosello, T., Figueroa, A., Salgado, H., Vilchis, C., Tecuapetla, F., Guzman, J.N., Galarraga, E., Bargas, J. (2005):

Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of Ca(V)2.1 and Ca(V)2.2 Ca²⁺ channels. *J Neurophysiol* 93: 2507-2519.

Perlmutter, J. S. und Mink, J. W. (2004):

Dysfunction of dopaminergic pathways in dystonia. *Adv Neurol* 94: 163-170.

Perlmutter, J. S, Stambuk, M. K., Markham, J., Black, K. J., McGee-Minnich, L., Jankovic, J., Moerlein, S. M. (1997a):

Decreased [18F]spiperone binding in putamen in idiopathic focal dystonia. *J Neurosci* 17: 843-850.

Perlmutter, J. S., Tempel, L. W., Black, K. J., Parkinson, D., Todd, R. D. (1997b):

MPTP induces dystonia and parkinsonism. Clues to the pathophysiology of dystonia. *Neurology* 49: 1432-1438.

Peterson, D. A., Sejnowski, T. J., Poitzner, H. (2010):

Convergent evidence for abnormal striatal synaptic plasticity in dystonia. *Neurobiol Dis* 37 (3): 558-573.

Piggott, M., Owens, J., O'Brien, J., Paling, S., Wyper, D., Fenwick, J., Johnson, M., Perry, R., Perry, E. (2002):

Comparative distribution of binding of the muscarinic receptor ligands pirenzepine, AF-DX 384, (R,R)-I-QNB and (R,S)-I-QNB to human brain. *J Chem Neuroanat* 24 (3): 211-223.

Pinninti, N. R., Mago, R., Adityanjee (2006):

Tardive dystonia-associated prescription of aripiprazole. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 18: 426-427.

Pisani, A., Bernardi, G., Ding, J., Surmeier, D. J. (2007):

Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci* 30: 545-553.

Pisani, A., Bonsi, P., Centonze, D., Calabresi, P., Bernardi, G. (2000):

Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons.

J Neurosci 20: RC69.

Pisani A., Martella G., Tscherter A., Bonsi P., Sharma N., Bernardi G., Standaert, D. G. (2006):

Altered responses to dopaminergic D2 receptor activation and N-type calcium currents in striatal cholinergic interneurons in a mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis* 24: 318-325.

Platel, A. und Porsolt, R. D. (1982):

Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 78 (4): 346-352.

Playford, E. D., Fletcher, N. A., Sawle, G. V., Marsden, C. D., Brooks, D. J. (1993):

Striatal [18F] dopa uptake in familial idiopathic dystonia. *Brain* 116: 1191-1199.

Potier, S. und Psarropoulou, C. (2004):

Modulation of muscarinic facilitation of epileptiform discharges in immature rat neocortex. *Brain Res* 997: 194-206.

Pollack, A. E. (2001):

Anatomy, physiology, and pharmacology of the basal ganglia. *Neurol Clin* 19 (3): 523-534.

Quartarone, A., Bagnato, S., Rizzo, V., Siebner, H. R., Dattola, V., Scalfari, A., Morgante, F., Battaglia, F., Romano, M., Girlanda, P. (2003):

Abnormal associative plasticity of the human motor cortex in writer's cramp. *Brain* 126: 2586-2596.

Quartarone, A., Rizzo, V., Morgante, F. (2008):

Clinical features of dystonia: a pathophysiological revisitation. Curr Opin Neurol 21: 484-490.

Quartarone, A., Siebner, H. R. & Rothwell, J. C. (2006):

Task-specific hand dystonia: can too much plasticity be bad for you? Trends Neurosci 29: 192-199.

Quirion, R., Robitaille, Y., Martial, J., Chabot, J. G., Lemoine, P., Pilapil, C., Dalpé, M. (1987):

Human brain receptor autoradiography using whole hemisphere sections: a general method that minimizes tissue artefacts.

Synapse 1 (5): 446-454.

Rainier, S., Thomas, D., Tokarz, D., Ming, L., Bui, M., Plein, E., Zhao, X., Lemons, R., Albin, R., Delaney, C., Alvarado, D., Fink, J. K. (2004):

Myofibrillogenesis regulator 1 gene mutations cause paroxysmal dystonic choreoathetosis. Arch Neurol. 61 (7): 1025-1029.

Raike, R. S., Jinnah, H. A., Hess, E. J. (2005):

Animal models of generalized dystonia. NeuroRx 2: 504-512.

Ramsey, I. K., Chandler, K. E., Franklin, R. J. (1999):

A movement disorder in boxer pups. Vet Rec 144 (7): 179-180.

Rehders, J. H. (1999)

Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung der striatalen dopaminergen Neurotransmission bei einer Hamstermutante mit idiopathischer paroxysmaler Dystonie. Dissertationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Rehders, J. H., Löscher, W., Richter, A. (2000):

Evidence for striatal dopaminergic overactivity in paroxysmal dystonia indicated by microinjections in a genetic rodent model. Neuroscience 97: 267-277.

Reynolds, J. N. und Wickens, J. R. (2004):

The corticostriatal input to giant aspiny interneurons in the rat: a candidate pathway for synchronising the response to reward-related cues. Brain Res 1011: 115-128.

Richter, A. (2005):

The Genetically Dystonic Hamster: An Animal Model of Paroxysmal Dystonia. In: Animal Models of Movement Disorders. / M. LeDoux (Hrsg.). Burlington: Elsevier Academic Press. -S. 459-466.

Richter, A. und Hamann M. (2001):

Effects of adenosine receptor agonists and antagonists in a genetic animal model of primary dvstonia.

Br J Pharmacol 134: 343-352.

Richter, A. und Löscher, W. (1993):

Alterations in pharmacological sensitivity of GABAergic but not dopaminergic and glutamatergic systems during ontogenesis in dystonic mutant hamsters. *Eur J Pharmacol* 231: 111-119.

Richter, A. und Löscher, W. (1995):

Behavioural response to pharmacologic manipulation of serotonin receptors in the genetically dystonic hamster.

Pharmacol Biochem Behav 52 (4): 655-665.

Richter, A. und Löscher, W. (1998):

Pathology of idiopathic dystonia: findings from genetic animal models. *Prog Neurobiol* 54 (6): 633-677.

Richter, A. und Löscher, W. (2000):

Animal models of dystonia. *Funct Neurol* 15 (4): 259-267.

Richter, A. und Löscher, W. (2002):

Animal models of paroxysmal dystonia. *Adv Neurol* 89: 443-451.

Richter, A., Brotchie, J. M., Crossman, A. R., Löscher, W. (1998):

[3H]-2-deoxyglucose uptake study in mutant dystonic hamsters: abnormalities in discrete brain regions of the motor system.

Mov Disord 13 (4): 718-725.

Richter, A., Sander, S. E., Rundfeldt, C. (2006):

Antidystonic effects of Kv7 (KCNQ) channel openers in the dt sz mutant, an animal model of primary paroxysmal dystonia. *Br J Pharmacol* 149 (6): 747-753.

Richter, F. (2007):

Untersuchungen zur Entwicklung eines neuen Mausmodells der Parkinson-Krankheit für die Bewertung neuroprotektiver Substanzeffekte. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin, Berlin.

Richter, F., Hamann, M., Richter, A. (2008):

Moderate degeneration of nigral neurons after repeated but not after single intrastriatal injections of low doses of 6-hydroxydopamine in mice. *Brain Res* 1188: 148-156.

Risch, N., Bressman, S., Senthil, G., Ozelius, L. (2007):

Intragenic cis and transmodification of genetic susceptibility in DYT1 torsion dystonia. *Am J Hum Genet* 80: 1188-1193.

Rivest, J., Quinn, N., Marsden, C. D. (1990):

Dystonia in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy.

Neurology 40 (10): 1571-1578.

Role, L. W. und Berg D. K. (1996):

Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16: 1077-1085.

Rostasy, K., Augood, S. J., Hewett, J. W., Leung, J. C., Sasaki, H., Ozelius, L. J., Ramesh, V., Standaert, D. G., Breakefield, X. O., Hedreen, J. C. (2003):

TorsinA protein and neuropathology in early onset generalized dystonia with GAG deletion. *Neurobiol Dis* 12: 11-24.

Rupniak, N. M., Jenner, P., Marsden, C. D. (1986):

Acute dystonia induced by neuroleptic drugs. *Psychopharmacology* (Berl) 88: 403-419.

Rusbridge, C. (2005):

Neurological diseases of the Cavalier King Charles spaniel. *J Small Anim Pract.* 46 (6): 265-272.

Russel, W. M. S. und Burch, R. L. (1959):

The principles of humane experimental Technique. London: Methuen & Co.Ltd. [Reissued: 1992, Universities Federation for Animal Welfare, Herts, England] http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm.

Rymar, V. V., Sasseville, R., Luk, K. C., Sadikot, A. F. (2004):

Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *J Comp Neurol* 469 (3): 325-339.

Saint Hilaire, M.H., Burke, R.E., Bressman, S.B., Brin, M.F. & Fahn, S. (1991):

Delayed-onset dystonia due to perinatal or early childhood asphyxia. *Neurology* 41: 216-222.

Sander, S. E. (2004):

Pharmakologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Bedeutung striataler Fehlfunktionen des glutamatergen Systems in einem Tiermodell für die primäre paroxysmale Dystonie. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin, Berlin.

Sander, S. E., und Richter, A. (2007):

Effects of intrastriatal injections of glutamate receptor antagonists on the severity of paroxysmal dystonia in the dt^{sz} mutant. *Eur J Pharmacol* 563: 102-108.

Sander, S. E., Hamann, M., Richter, A. (2006):

Age-related changes in striatal nitric oxide synthase-immunoreactive interneurones in the dystonic dt^{sz} mutant hamster.

Neuropathol Appl Neurobiol 32: 74-82.

Santafé, M. M., Salon, I., Garcia, N., Lanuza, M. A., Uchitel, O. D., Tomàs, J. (2003):

Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat.

Eur J Neurosci 17 (1): 119-127.

Scarr, E. und Dean, B. (2008):

Muscarinic receptors: do they have a role in the pathology and treatment of schizophrenia? *J Neurochem* 107: 1188-1195.

Schenkel, J. (2006):

Analyse transgener Tiere. In: Transgene Tiere. / (Hrsg.). Berlin: Springer-Verlag. - S. 113-118.

Schiffmann, S. N., Jacobs, O., Vanderhaeghen, J. J. (1991):

Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. *J Neurochem* 57: 1062-1067.

Schlösser, B., Klausa, G., Prime, G., Ten Bruggencate, G. (1999):

Postnatal development of calretinin- and parvalbumin-positive interneurons in the rat neostriatum: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 405 (2): 185-198.

Schmidt, A. und Klein, C. (2010):

The role of genes in causing dystonia. *Eur J Neurol.* 17 (1): 65-70.

Schmidt, A., Schneider, S. A., Hagenah, J., Klein, C. (2008):

Dystonia. *Nervenarzt* 79 (2): 53-63.

Schneider, S. A., Bhatia, K. P., Hardy, J. (2009):

Complicated recessive dystonia parkinsonism syndromes. *Mov Disord* 24 (4): 490-499.

Sciamanna, G., Bonsi, P., Tassone, A., Cuomo, D., Tscherter, A., Viscomi, M. T., Martella, G., Sharma, N., Bernardi, G., Standaert, D. G., Pisani, A. (2009): Impaired striatal D2 receptor function leads to enhanced GABA transmission in a mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis* 34 (1): 133-145.

Sciamanna, G., Tassone, A., Martella, G., Mandolesi, G., Puglisi, F., Cuomo, D., Madeo, G., Ponterio, G., Standaert, D. G., Bonsi, P., Pisani, A. (2011): Developmental profile of the aberrant dopamine D2 receptor response in striatal cholinergic interneurons in DYT1 dystonia. *PLoS One* 6 (9): e24261.

Semba, K. und Fibiger, H.C. (1989):

Organization of central cholinergic systems. *Prog Brain Res* 79: 37-63.

Servent, D. und Fruchart-Gaillard, C. (2009):

Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J Neurochem* 109 (5): 1193-1202.

Sesack, S. R. und Grace, A. A. (2010):

Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 35 (1): 27-47.

Shahed, J. und Jankovic, J. (2007):

Introduction to dystonia. In: Handbook of dystonia. Stacy MA, editor. New York: Informa Healthcare; 2007. - S. 1-10.

Sharma, N., Baxter, M. G., Petravicz, J., Bragg, D. C., Schienda, A., Standaert, D. G., Breakefield, X. O. (2005):

Impaired motor learning in mice expressing torsinA with the DYT1 dystonia mutation. *J Neurosci* 25 (22): 5351-5355.

Sharma, S., Rodriguez, A. L., Conn, P. J., Lindsley, C. W. (2008):

Synthesis and SAR of a mGluR5 allosteric partial antagonist lead: unexpected modulation of pharmacology with slight structural modifications to a 5-(phenylethynyl)pyrimidine scaffold. *Bioorg Med Chem Lett* 18 (14): 4098-4101.

Shashidharan, P., Good, P. F., Hsu, A., Perl, D. P., Brin, M. F., Olanow, C. W. (2000b): TorsinA accumulation in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Brain Res* 877: 379-381.

Shashidharan, P., Kramer, B. C., Walker, R. H., Olanow, C. W., Brin, M. F. (2000a): Immunohistochemical localization and distribution of torsinA in normal human and rat brain. *Brain Res* 853: 197-206.

Shashidharan, P., Sandu, D., Potla, U., Armata, I. A., Walker, R. H., McNaught, K. S., Weisz, D., Sreenath, T., Brin, M. F., Olanow, C. W. (2005): Transgenic mouse model of earlyonset DYT1 dystonia. *Hum Mol Genet* 14: 125-133.

Shen, W., Tian, X., Day, M., Ulrich, S., Tkatch, T., Nathanson N. M., Surmeier D. J. (2007):

Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons.

Nat Neurosci 10: 1458-1466.

Shirey, J. K., Xiang, Z., Orton, D., Brady, A. E., Johnson, K. A., Williams, R., Ayala, J. E., Rodriguez, A. L., Wess, J., Weaver, D., Niswender, C. M., Conn, P. J. (2008): An allosteric potentiator of M4 mAChR modulates hippocampal synaptic transmission. *Nat Chem Biol* 4 (1): 42-50.

Sidibe, M. und Smith, Y. (1999):

Thalamic inputs to striatal interneurons in monkeys: synaptic organization and co-localization of calcium binding proteins. *Neuroscience* 89: 1189-1208.

Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., Ronen, G. M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J. V., McHarg, M. L., Gagnon, D., Rosales, T. O., Peiffer, A., Anderson, V. E., Leppert, M. (1998):

A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18 (1): 25-29.

Sirviö, J. und Riekkinen, P. J. (1992):

Brain and cerebrospinal fluid cholinesterases in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and aging. A critical review of clinical and experimental studies. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 4: 337-358.

Smiljanic, S. (2010):

Untersuchungen zur Wirkung systemischer und intrastriataler Applikationen von Tropicamid in einem Tiermodell für die paroxysmale Dystonie. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin, Berlin.

Smith, Y. und Parent, A. (1986):

Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the striatum of cat and monkey: morphological characteristics, intrinsic organization and co-localization with somatostatin. *Brain Res* 372: 241-252.

Smith, Y., Bennett, B. D., Bolam, J. P., Parent, A., Sadikot, A. F. (1994):

Synaptic relationships between dopaminergic afferents and cortical or thalamic input in the sensorimotor territory of the striatum in monkey. *J Comp Neurol* 344. 1-19.

Smith, Y., Shink, E., Sidibe, M. (1998):

"Neuronal circuitry and synaptic connectivity of the basal ganglia." *Neurosurg Clin N Am* 9 (2): 203-222.

Sotelo, C. und Guenet, J. L. (1988):

Pathologic changes in the CNS of dystonia musculorum mutant mouse: an animal model for human spinocerebellar ataxia. *Neuroscience* 27 (2): 403-424.

Spalding, T. A., Trotter, C., Skjaerbaek, N., Messier, T. L., Currier, E. A., Burstein, E. S., Li, D., Hacksell, U., Brann, M. R. (2002):

Discovery of an ectopic activation site on the M(1) muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* 61 (6): 1297-302.

Spatola, M. und Wider, C. (2012):

Overview of primary monogenic dystonia. *Parkinsonism Relat Disord* 18 (1): 158-161.

Spinella, G. M. und Sheridan, P. H. (1994):

Research opportunities in dystonia: National Institute of Neurological Disorders and Stroke workshop summary. *Neurology* 44 (6): 1177-1179.

Starke, K. (2009):

Cholinerge Synapse. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage. Aktories, K., Förstermann, U. Hofmann, F., Starke, K. (Hrsg.). Begründet von Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U. / Elsevier GmbH München, Urban & Fischer Verlag, 2009. - S. 115.

Surmeier D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., Shen, W. (2007):

D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons.

Trends Neurosci 30: 228-235.

Tabbal, S. D., Mink, J. W., Antenor, J. A., Carl, J. L., Moerlein, S. M., Perlmutter, J. S. (2006):

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced acute transient dystonia in monkeys associated with low striatal dopamine. *Neuroscience* 141 (3): 1281-1287.

Taly, A., Corringer, P. J., Guedin, D., Lestage, P., Changeux, J. P. (2009): Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 8 (9): 733-750.

Tamura, Y., Ueki, Y., Lin, P., Vorbach, S., Mima, T., Kakigi, R., Hallett, M. (2009): Disordered plasticity in the primary somatosensory cortex in focal hand dystonia. *Brain* 132: 749-755.

Tanabe, L.M., Kim, C.E., Alagem, N., Dauer ,W.T. (2009):

Primary dystonia: molecules and mechanisms. Nat Rev Neurol 5 (11): 598-609.

Tarsy, D. und Simon, D.K. (2006):

Dystonia. N Engl J Med 355: 818-829.

Tepper, J. M. und Bolam, J. P. (2004):

Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. Curr Opin Neurobiol 14 (6): 685-692.

Tepper, J. M. und Plenz, D. (2005):

Microcircuits in the striatum-striatal cell types and their interaction. In: Microcircuits: The Interface Between Neurons and Global Brain Function, Dahlem Workshop Report 93. Edited by Grillner S, Graybiel A. Cambridge, MA: The MIT Press.

Tepper, J. M., Tecuapetla, F., Koós, T., Ibáñez-Sandoval, O. (2010):

Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. Front Neuroanat 4:150.

Teunissen, C. E., Steinbusch, H. W., Angevaren, M., Appels, M., de Bruijn, C., Prickaerts, J., de Vente, J. (2001):

Behavioural correlates of striatal glial fibrillary acidic protein in the 3-nitropropionic acid rat model: disturbed walking pattern and spatial orientation. Neuroscience 105: 153-167.

Thiel, C. M. und Fink, G. R. (2007):

Visual and auditory alertness: modality-specific and supramodal neural mechanisms and their modulation by nicotine. J Neurophysiol 97 (4): 2758-2768.

Tolosa, E. und Compta, Y. (2006):

Dystonia in Parkinson's disease. J Neurol 253 (7): VII7-13.

Torres, G. E., Sweeney, A. L., Beaulieu, J. M., Shashidharan, P., Caron, M. G. (2004): Effect of torsinA on membrane proteins reveals a loss of function and a dominant-negative phenotype of the dystonia-associated DeltaE-torsinA mutant. Proc Natl Acad Sci USA 101: 15650-15655.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979):

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354.

Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Bortolotto, Z. A., Mello, L.M., Schwarz, M., Turski, L. (1984):

Seizures produced by pilocarpine in mice: A behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. Brain Res 321: 237-253.

Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L. (1983):

Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: A behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9: 315-335.

Ukai, M., Okuda, A., Mamiya, T. (2004):

Effects of anticholinergic drugs selective for receptor subtypes on prepulse inhibition in mice. *Eur J Pharmacol* 492: 183-187.

Unterberger, I., Dobesberger, J., Walser G., Trinka, E., Bauer, G. (2007):

Paroxysmale Dyskinesien - Ein Überblick anhand eines Fallberichtes. *Zeitschrift für Epileptologie* 20 (3): 143-150.

Vale, R. D. (2000):

AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol* 150: F13-F19.

van Koppen, C. J und Nathanson, N. M. (1990):

Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. *J Biol Chem* 265 (34): 20887-20892.

van Vulpen EH und van der Kooy D. (1998):

Striatal cholinergic interneurons: birthdates predict compartmental localization. *Dev Brain Res* 109 (1): 51-58.

Vincent, S. R., Staines, W. A., Fibiger, H. C. (1983):

Histochemical demonstration of separate populations of somatostatin and cholinergic neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett* 35: 111-114.

Vitek, J. L. (2002):

Pathophysiology of dystonia: a neuronal model. *Mov Disord* 17 (3): 49-62.

Vitek, J. L. und Giroux, M. (2000):

Physiology of hypokinetic and hyperkinetic movement disorders: model for dyskinesia. *Ann Neurol* 47 (4/1): 131-140.

Vitek, J. L., Chockkan, V., Zhang, J. Y., Kaneoke, Y., Evatt, M., DeLong, M. R., Triche, S., Mewes, K., Hashimoto, T., Bakay, R. A. (1999):

Neuronal activity in the basal ganglia in patients with generalized dystonia and hemiballismus.

Ann Neurol 46: 22-35.

Voigtländer, U., Jöhren, K., Mohr, M., Raasch, A., Tränkle, C., Buller, S., Ellis, J., Höltje, H. D., Mohr, K. (2003):

Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M2 receptor that account entirely for the M2/M5 subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol* 64: 21-31.

Wahnschaffe, U., Fredow, G., Heintz, P., Löscher, W. (1990):

Neuropathological studies in a mutant hamster model of paroxysmal dystonia. *Mov Disord* 5 (4): 286-293.

Wang, H. und Morales, M. (2009):

Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 29: 340-358.

Wang, J. Q. und McGinty, J. F. (1996):

Intrastriatal injection of the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG attenuates acute amphetamine-stimulated neuropeptide mRNA expression in rat striatum. *Neurosci Lett* 218 (1): 13-16.

Wang, Z., Kai, L., Day, M., Ronesi, J., Yin, H. H., Ding, J., Tkatch, T., Lovinger, D. M., Surmeier, D. J. (2006):

Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron* 50: 443-452.

Weber, Y. G. und Lerche, H. (2009):

Genetics of paroxysmal dyskinesias. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9 (3): 206-211.

Weber, Y. G., Kamm, C., Suls, A., Kempfle, J., Kotschet, K., Schüle, R., Wuttke, T. V., Maljevic, S., Liebrich, J., Gasser, T., Ludolph, A. C., Van Paesschen, W., Schöls, L., De Jonghe, P., Auburger, G., Lerche, H. (2011):

Paroxysmal choreoathetosis/spasticity (DYT9) is caused by a GLUT1 defect. *Neurology* 77: 959-64.

Wenning, G. K., Kiechl, S., Seppi, K., Muller, J., Hogl, B., Saletu, M., Rungger, G., Gasperi, A., Willeit, J., Poewe, W. (2005):

Prevalence of movement disorders in men and women aged 50-89 years (Bruneck Study cohort): a population-based study.

Lancet Neurol 4 (12): 815-820.

Wess, J. (2004):

Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 423-445.

Wess, J., Eglen, R. M., Gautam, D. (2007):

Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 6 (9): 721-733.

Wevers, A. (2010):

Localisation of pre- and postsynaptic cholinergic markers in the human brain. *Behav Brain Res* 221 (2): 341-355.

Wichmann, T. (2008):

Commentary: Dopaminergic dysfunction in DYT1 dystonia. *Exp Neurol* 212 (2): 242-246.

Wichmann, T. und DeLong, M. R. (2003):

Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci* 991: 199-213.

Wider, C., Melquist, S., Hauf, M., Solida, A., Cobb, S. A., Kachergus, J. M., Gass, J., Coon, K. D., Baker, M., Cannon, A., Stephan, D. A., Schorderet, D. F., Ghika, J., Burkhard, P. R., Kapatos, G., Hutton, M., Farrer, M. J., Wszolek, Z. K., Vingerhoets, F. J. (2008):

Study of a Swiss dopa-responsive dystonia family with a deletion in GCH1: redefining DYT14 as DYT5.

Neurology 70: 1377-1383.

Wietholter, H., Eckert, S., Stevens, A. (1990):

Measurement of atactic and paretic gait in neuropathies of rats based on analysis of walking tracks.

J Neurosci Methods 32: 199-205.

Wilson, C. J., Chang, H. T., Kitai, S. T. (1990):

Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum.

J Neurosci 10: 508-519.

Wonnacott, S. (1997):

Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20: 92-98.

Woolf, N. J. (1991):

Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol* 37: 475-524.

Woolf, N. J. und Butcher, L. L. (2011):

Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behav Brain Res* 221 (2): 488-498.

Worms, P., Gueudet, C., Pério, A., Soubrié, P. (1989):

Systemic injection of pirenzepine induces a deficit in passive avoidance learning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 98 (2): 286-288.

Xu, L., Anwyl, R., Rowan, M. J. (1997):

Behavioural stress facilitates the induction of longterm depression in the hippocampus. *Nature* 387 (6632): 497-500.

Yan, Z., Flores-Hernandez, J., Surmeier, D.J. (2001):

Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons.

Neuroscience 103: 1017-1024.

Yan, Z. und Surmeier, D. J. (1996):

Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N-and P-type Ca2+ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* 16: 2592-2604.

Yan, Z. und Surmeier, D. J. (1997):

D5 dopamine receptors enhance Zn2+-sensitive GABA(A) currents in Striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade. *Neuron* 19: 1115-1126.

Yan, Z., Song, W. J., Surmeier, J. (1997):

D2 dopamine receptors reduce N-type Ca2+ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol* 77: 1003-1015.

Yoon, C. H., Peterson, J. S., Corrow, D. (1976):

Spontaneous seizures: a new mutation in Syrian golden hamsters. *J Hered* 67 (2): 115-116.

Young, K. G. und Kothary, R. (2008):

Dystonin/Bpag1 is a necessary endoplasmic reticulum/nuclear envelope protein in sensory neurons.

Exp Cell Res 314 (15): 2750-2761.

Zhao, Y., Decuypere, M., LeDoux, M. S. (2008):

Abnormal motor function and dopamine neurotransmission in DYT1 DeltaGAG transgenic mice.

Exp Neurol 210: 719-730.

Zhou, F. M., Wilson, C. J., Dani, J. A. (2002):

Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol* 53: 590-605.

Ziefer, P., Leung, J., Razzano, T., Lorden, J., Shalish, C., Ozelius, L. J., Standaert, D., Breakefield, X. O., Augood, S. (2002):

Molecular cloning and expression of rat torsinA in the normal and genetically dystonic (dt/dt) rat.

Brain Res Mol Biol 101: 132-135.

Internet-Seiten:

Quelle Hamsterbild: Acorn Internet Ltd: Pet Web Site: Syrian Hamsters. (Abrufdatum: 05.06.2012)

http://www.petwebsite.com/hamsters/hamsters_images/syrian-hamster_000008437184.jpg © istockphoto.com/karlbarrett.

Sigma-Aldrich Sicherheitsdatenblatt zu Pirenzepine dihydrochloride, gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006, Version 4.0. Überarbeitet am 28.01.2011, Druckdatum 18.06.2012: Sigma P7412 S. 6.

http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=DE&language=d e&productNumber=P7412&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigma aldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fp7412%3Flang%3Dde © 2011 Sigma-Aldrich Co.

9. TABELLARISCHER ANHANG

Tab. I und II: Verwendete Substanzen, Geräte und Programme

I. Substanzen

Substanz	Firma					
Actin beta/ACTB [β-Actin]	Acris Antibodies GmbH, Herford					
Agarose	Roth, Karlsruhe					
Amersham Hybond-P PVDF Membran	GE-Healthcare, Freiburg					
Amersham ECL blocking agent	GE Healthcare, Freiburg					
Amersham [™] ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare Freiburg					
Amersham ECL anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-specific whole antibody from donkey	GE Healthcare, Freiburg					
anti-choline-acetyltransferase aus Kaninchen IgG [ChAT]	Chemicon, Temecula, CA, USA					
anti-choline-acetyltransferase polyklonaler Ak aus Kaninchen IgG [ChAT]	Thermo Scientific, Pierce Antibodies, Rockford, USA					
BSA: Rinderserumalbumin	Sigma Aldrich					
2-(Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin	Sigma-Aldrich, Steinheim					
Rimadyl® (Carprofen)	Pfizer, Berlin					
Chromalaun: Chrom(III)-Kaliumsulfat- Dodecahydrat	Merck, Darmstadt					
Coomassie Blue G 250	Roth, Karlsruhe					
DAB: 3,3' Diaminobenzidin	DAKO, Hamburg					
DNA Leiter 100 bp	Rapidozym, Berlin					
DEPC RNAse freies Wasser	PEQLAB, Erlangen					
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na2HPO4 x 2 H20)	Roth, Karlsruhe					
DMSO: Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim					
DTT: 1,4-Dithiothreit	Roth, Karlsruhe					
Entellan®	Merck, Darmstadt					
Entwickler-Lösung Kodak-G150	Agfa, Köln					
Essigsäure für Thioninlösung	Roth, Karlsruhe					
Ethanol	Roth, Karlsruhe					

Substanz	Firma					
Ethidiumbromid 1%	Roth, Karlsruhe					
EURx® Gene Matrix Stool DNA kit	Roboklon GmbH, Berlin					
Fixier-Lösung Kodak-G354	Agfa, Köln					
Gelatine	Roth, Karlsruhe					
Glycin	Roth, Karlsruhe					
Laemmli-Lysis-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen					
Laufpuffer 6 x Roti®-Load DNA mit Glycerin,	Roth, Karlsruhe					
Natriumchloridlösung (0,9 %)	B.Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen					
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe					
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe					
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH2PO4 x 2 H2O	Roth, Karlsruhe					
Nickelammoniumsulfat	Fluka / Sigma Aldrich					
N-Methyl-Scopolamin	Sigma-Aldrich, Steinheim					
PAA-Gel	anamed Elekrophorese GmbH, Groß- Bieberau					
Paladur®	Heraeus Kulzer, Hanau					
Paraformaldehyd	Riedel-de-Haen					
Pentobarbital	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA					
Pierce BCA Protein Assay kit	Thermo Scientific, Rockford, USA					
Pirenzepin	Sigma-Aldrich, Steinheim					
Pilocarpin	Sigma-Aldrich, Steinheim					
Plaka® Farbe	Pelikan, Hannover					
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen					
Precision Plus Protein tm Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA					
Primer	TIB MOLBIOL, Berlin					
PS: Schweine-Normalserum	DAKO, Hamburg					
Schwein-anti-Kaninchen IgG [bPaR]	DAKO, Hamburg					
S.D.S-Pellets	Roth, Karlsruhe					
Streptavidin, HRP-konjugiert	DAKO, Hamburg					
Taq-DNA-Polymerase 'all inclusive'	PEQLAB, Erlangen					
Terpineol	Roth, Karlsruhe					

Substanz	Firma
Thionin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thymol	Caesar & Loretz, Hilden
Trihexyphenidyl	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS	Roth, Karlsruhe
Tropicamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasser für Injektionszwecke	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe
VU0152100	Axon Medchem, Groningen, NL
XEM: Xylolersatzmedium (rotihistol®)	Roth, Karlsruhe

II. Geräte und Programme

Geräte und Programme	Firma			
Activity Cage Model 7420	Ugo Basile, Comerio, VA, Italien			
Binokular Stemi DV4	Zeiss, Jena			
Bohrmaschine	Dremel, Breda, Niederlande			
Bildanalysesystems	Visitron Systems GmbH, Puchheim			
Bildschirm	Panasonic, Hamburg			
BioDoc® CCD-Camera	Biometra Göttingen			
Tisch-Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg			
Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg			
Eppendorf Reference Pipetten	Eppendorf, Hamburg			
Feinwaage Sartorius M2P max. 2 g	Sartorius AG/Mechatronik			
Feinwaage Sartorius max. 200 g	Sartorius AG/Mechatronik			
Grip-strength Meter Model 47106	Ugo Basile, Comerio, VA, Italien			
Haake Wasserbad B3 mit digitalem Einhängethermostat D1	Haake, Karlsruhe			
Hamilton-Spritze	Bonaduz, Schweiz			
Heidolph Duomax 1030 mit Inkubator 1000	Heidolph, Schwabach			
Hoefer [™] mighty small transphor unit	Hoefer Inc., Massachusetts, USA			

Geräte und Programme	Firma
Hyperfilm [™] ECL Amersham-Biosciences	GE Healthcare, Freiburg
Kern KB max. 510 g	Labortechnik Ziege, Luckenwalde
M2P/Zubehör	Sartorius AG, Göttingen
Magnetrührer	Janke & Kunkel KG, Staufen in Breisgau
Mikrotom	Microm, Walldorf
Mikrotubus	CMA, Solna, Schweden
Mini-Horizontal Elektrophorese-Kammer Agagel Standard ohne Kühlung, Typ G 45/1,	Biometra, Göttingen
Mini-Vertikal Doppel Elektrophorese- Kammer Standard	Roth, Karlsruhe
MS1 Minishaker	Janke & Kunkel KG, Staufen in Breisgau
Nahtmaterial	Vicryl Ethicon GmbH, Norderstedt
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer Boiwave S 2100,	Biochrom, Cambridge, UK
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Pro-Trimmer Modell 76997	Oster GmbH, Boca Raton, FL
Rollenmischer RM5-V	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Rotarod Modell 7650, Robert & Jones	Ugo Basile, Comerio, VA, Italien
Sigma Plot 8.0	Systat Software Inc., San Jose, USA
Sigma Plot 11.0	Systat Software Inc., San Jose, USA
Sigma Stat 3.0	Systat Software Inc., San Jose, USA
Stereotakt	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Thermocycler TRIO-Thermoblock TB 1	Biometra, Göttingen
Thermodrucker UP-890CE	Sony, Heerlen, NL
Thermomixer T-Mix	Analytik Jena, Jena
Tuttnauer Tischautoklav, Model 2540 EK	Tuttnauer, Breda, NL
UV-Schirm TI1	Biometra, Göttingen

Tab. A-E: Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen

A. Immunhistochemie

Lösung	Zusammensetzung	Herstellung				
TBS (TRIS-gepufferte isotone Kochsalzlösung)	9 g NaCl 6,06 g TRIS 1000 ml Aqua dest.	mit in lösen und den pH mit 32%iger Salzsäure auf 7,6 einstellen				
"Carrier"-Lösung	100 ml TBS 1 g Rinderserumalbumin 1 ml Schweine-Serum 1,5 ml 20% Triton X-100					
"Blocking"-Lösung	4,5 ml Carrier-Lösung 100 mg Rinderserumalbumin 0,5 ml Schweine-Serum					
TRIS / Nickel-Lösung	0,3 g Nickelammoniumsulfat 50 ml TBS	in lösen; dann den pH auf 7,6 einstellen				
DAB- (Diaminobenzidin-) lösung	30 µl Ansatz (entspricht 3,3 mg 3,3'-DAB) 4 ml TRIS / Nickel-Lösung					
Gelatinelösung	3,5 g Gelatine (gepulvert) 0,35 g Chromalaun 500 ml Aqua dest. 1 Thymolkristall	und werden zusammen in gegeben und unter Rühren auf 60°C erhitzt (Auflösen der Gelatine), zusätzlich wird zugegeben (Haltbarkeit)				

B. Westernblot

Lösung	Zusammensetzung	Herstellung			
10 x Laufpuffer	30 g TRIS 144 g Glycin Aqua dest. 10 g SDS	und mit auf 1I auffüllen hinzugeben und unter Rühren lösen			
1 x Laufpuffer	100 ml 10 x Laufpuffer 900 ml Aqua dest.	mit verdünnen			
Transferpuffer	6,057 g TRIS 28,82 g Glycin 200 ml Methanol Aqua dest.	mit auf 2I auffüllen und unter Rühren lösen			
Coomassie-Färbelösung	40 ml Ethanol 50 ml Aqua dest. 0,1 g Coomassie Blue G 250 10 ml Eisessig	miteinander vermischen und unter Rühren gut lösen, zugeben und anschließend durch einen Faltenfilter filtrieren			
Entfärbelösung	50 ml Ethanol Aqua dest. 75 ml Eisessig Aqua dest.	mit auf 900 ml auffüllen, dann unter Rühren hinzugeben und den Rest mit auf 1I auffüllen			
10 x TBS	80 g NaCl 24,2 g TRIS 700 ml Aqua dest. Aqua dest.	und in ca. lösen und und den pH mit 32%iger Salzsäure auf 7,6 einstellen, anschließend mit auf 1I auffüllen			
1 x TBS	100 ml_10 x TBS 900 ml_Auqa dest.	mit verdünnen			
TBS-Tween (0,1%)	1I 1 x TBS 1 ml Tween 20	mit vermengen			
Blockingpuffer (0,5 %)	0,5 g Blocking agent 10 ml TBST	unter Rühren in lösen			
Stripping-Puffer	0,1 ml 10 M NaOH 0,2 g SDS 0,05 g DTT Aqua dest.	mit auf 10 g auffüllen und unter Rühren lösen			

Lösung	Zusammensetzung	Herstellung				
8 %iges Paraformaldehyd	1000 ml Aqua dest. 80 g Paraformaldehyd 10 M NaOH	auf 60°C erhitzen, unter Rühren hinzugeben mit klären und anschließend filtrieren				
4 %iges Paraformaldehyd	500 ml 8 % Paraformaldehyd 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer	mit verdünnen				
30 %ige Zuckerlösung	30 g raffinierten Zucker 70 g 0,1 M Phosphatpuffer	unter Rühren in lösen				
Gelatinelösung	3,5 g Gelatine (gepulvert)0,35 g Chromalaun500 ml Aqua dest.1 Thymolkristall	und werden zusammen in gegeben und unter Rühre auf 60°C erhitzt (Auflösen de Gelatine), zusätzlich wird zugegeben (Haltbarkeit)				
Thioninlösung	100 ml 1 M Essigsäure36 ml 1 M Natronlauge864 ml Aqua dest.1,25 g Thionin	und mit auf einen Liter auffüllen und auf 60°-70°C erhitzen, darin lösen Lösung eine Stunde rühren und anschließend heiß filtrieren				

C. Gehirnaufbereitung zur Überprüfung der Lokalisation der Führungskanülen

D. Grundlegende Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung)	57 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 12,48 g NaH ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 750 ml Aqua dest. Aqua dest.	und in ca. unter Rühren lösen, den pH mit NaOH auf 7,4 einstellen, und mit auf 1I auffüllen
0,2 M Phosphatpuffer	0,4 M Phosphatpuffer Aqua dest.	mit 1:1 verdünnen
0,1 M Phosphatpuffer	0,2 M Phosphatpuffer Aqua dest.	mit 1:1 verdünnen
0,01 M phosphatgepufferte Saline	100 ml 0,1 M Phosphatpuffer 9 g NaCl Aqua dest.	mit auf 1000 ml auffüllen

Lösung	Zusammensetzung	Herstellung				
10 x TAE	48,4 g TRIS (0,4 M) 11,42 ml Eisessig (0,2 M) 2,92 g EDTA (10 mM) Aqua dest.	mit auf 1I auffüllen				
1 x TAE	100 ml 10 x TAE Aqua dest.	mit auf 1I auffüllen				
1%iges Agarosegel	1 g Agarose 1xTAE	mit auf 100 ml auffüllen und auf- kochen bis die Flüssigkeit klar ist, anschließend abkühlen lassen, bei Eintritt von Schlierenbildung mit				
	5 µl Etidiumbromid	versetzen und sofort in die vorbereitete Elektrophorese- kammer gießen				

E. Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen für das Agarosegel

Protokoll Thionin-Färbung:

Die Objektträger mit den aufgezogenen Gehirnschnitten wurden nach folgendem Schema angefärbt:

3	min	100% Ethanol
3	min	95% Ethanol
3	min	70% Ethanol
3	min	50% Ethanol
3	min	Aqua dest.
75-90	sec	Thionin
3	min	50% Ethanol
3	min	70% Ethanol
3	min	95% Ethanol
3	min	100% Ethanol
3	min	Terpinol/XEM
3	min	XEM I
3	min	XEM II

Am Ende der Färbereihe erfolgte das Eindecken der Objektträger mit Entellan®. XEM = Xylolersatzmedium (rotihistol®, Roth, Karlsruhe, BRD)

Protokoll für die DNA-Extraktion aus Kot mit dem "GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit" der Firma EURx (roboklon)

Vorbereitung:

- Thermomixer auf 70° C vorheizen
- Elution Puffer auf 70° C erhitzen
- Aktivierung der Membran
- alle Komponenten sollen Raumtemperatur aufweisen
- 1. Aktivierung der Membran: Gib 40 µl Buffer ST auf die DNA- bindende spincolumn (bei Raumtemperatur stehen lassen)
- 2. 200 mg Kot (frisch oder gefroren) in ein Bead-Tube (enthält Perlen und Pufferlsg.) geben
- 3. Vortexen bis Probe homogenisiert ist
- 4. 60 µl Lyse ST hinzu, 1 min vortexen
- 5. Inkubation der Probe für 5 min bei 70° C im Thermomixer
- 6. Vortexen für 10 min oder einen Zellzerstörer verwenden
- 7. Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 2 min
- 8. 400 µl des Überstandes in ein 2 ml microcentrifuge tube überführen
- 9. Füge 400 µl PR Puffer hinzu und kurz vortexen (5s)
- 10. Inkubation der Probe für 5 min auf Eis
- 11. Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 2 min
- 12. 550 µl des Überstandes in ein neues 2 ml microcentrifuge tube überführen
- 13. 650 µl Sol ST hinzugeben
- 14. 400 μl 96% Ethanol hinzu und mische gründlich (vortexen)+ kurz zentrifugieren
- 15. Überführe 600 µl der Lösung auf eine spin-column (collection tube)
- 16. Zentrifugieren bei 12.000 rpm für 1 min
- 17. Verwerfe das Filtrat, setze den Spin-Filter wieder in das Tube ein
- 18. Wiederhole diesen Schritt 15-17 Mal
- 19. Gleiches Verfahren mit der restlichen Lösung
- 20. Verwerfe das Filtrat, setze den Spin-Filter wieder in das Tube ein
- 21. Gebe 500 µl Wash STX auf den Filter
- 22. Zentrifugieren bei 12.000 rpm für 1 min
- 23. Verwerfe das Filtrat, setze den Spin-Filter wieder in das Tube ein
- 24. Gebe erneut 500 µl Wash STX auf den Filter
- 25. Zentrifugieren bei 12.000 rpm für 2 min
- 26. Setze den Spin-Filter in ein neues Sammelröhrchen (1,5-2 ml) und gebe 100 200 µl Elution Puffer (10 mM Tris-HCL, pH 8,5) hinzu.
 (den Puffer vorher auf 70 ° C erhitzen, damit sich die DNA löst!!!)
- 27. Inkubation der Probe für 2 min bei Raumtemperatur
- 28. Zentrifugieren bei 12.000 rpm für 30 sec
- 29. den Filter verwerfen
- 30. im Filtrat den DNA-Gehalt photometrisch bestimmen

Gemeinsame Legende für die Tabellen 1 bis 19

In den aufgeführten Tabellen sind die im Rahmen der pharmakologischen Untersuchungen erzielten Daten der einzelnen *dt*^{sz}-Hamster, die in die statistische Auswertung einbezogen wurden, hinsichtlich der erreichten Schweregrade sowie der Latenzzeiten bis zum Einsetzen erster eindeutiger dystoner Bewegungsstörungen ("Latency on") bzw. bis zum Erreichen des maximalen Stadiums der Dystonie ("Latency max") aufgeführt. Über den Tabellen sind die verwendeten Wirkstoffe und Dosierungen für die akut systemischen und die bilateralen striatalen Applikationen (Tab. 1 bis 5 und 12 bis 19) angegeben. In Tabelle A sind jeweils die maximal erreichten Schweregrade der ersten, zweiten und dritten Beobachtungsstunde aufgeschlüsselt nach Vorkontrolle (Pre), Substanzgabe (Drug) und Nachkontrolle (Post) für jedes einzelne Tier aufgeführt. Die Käfig- bzw. Wurfnummer sowie die dazugehörigen Tiernummer und die Angabe des Geschlechts erlauben Rückschlüsse auf die im jeweiligen Versuch verwendeten Tiere. Die Aufteilung des Beobachtungszeitraumes in drei Stunden diente der genaueren Beurteilung der Progression der Dystonie beim dt^{sz}-Hamster und ermöglichte somit Rückschlüsse auf das Einsetzen sowie die Dauer der Wirkung der eingesetzten Testsubstanzen. In Tabelle B sind die in der Vorkontrolle (Pre), unter Substanzgabe (Drug) und der Nachkontrolle (Post) ermittelten Latenzzeiten bis zum Einsetzen erster eindeutiger dystoner Bewegungsstörungen (Stadium 2: Latency on) bzw. bis zum Einsetzen des maximalen Stadiums der Dystonie (Stadium 6: Latency max) für jedes einzelne Tier in Minuten (min) aufgelistet.

Im Falle der chronisch systemischen Versuche (Tab. 6 bis 11) sind die Werte aller Tiere einer Gruppe dem Alter in Lebenstagen, den Dosierungen der Substanz- bzw. Vehikelgabe sowie der anschließenden Verlaufskontrolle zugeordnet. Die gestrichelte Linie markiert den Beginn der Verlaufskontrolle, bei der beiden Tiergruppen bis zum 59. bzw. 60. Lebenstag 0,9%ige Kochsalzlösung appliziert wurde, um den Einfluss der Langzeitbehandlung auf den Zeitverlauf der Spontanremission sowie einen möglichen Rebound-Effekt nach Absetzen der Testsubstanz abzuklären.

Die statistischen Angaben sind jeweils den unteren drei Zeilen der beiden Tabellenteile zu entnehmen und umfassen den Mittelwert (M.W.), den Standardfehler (S.E.) und die Standardabweichung (S.D.) der an den einzelnen Versuchstagen ermittelten Schweregrade der Dystonie und der Latenzzeiten bis zum Auftreten erster dystoner Symptome. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels einer Friedmann-Varianzanalyse mit nachfolgendem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen. Die Latenzzeiten bis zum Einsetzen des Stadiums 6 ("Latency max") wurde nicht ausgewertet, da die Voraussetzung, dass pro Tiergruppe mindestens fünf Tiere das Stadium 6 sowohl in beiden Vehikelkontrollen als auch unter Substanzgabe aufweisen, bei keinem der applizierten Wirkstoffe gegeben war. Tab. 1: Einmalige systemische Applikation (i.p.) von Tropicamid + Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 15 mg/kg + 10 mg/kg sowie 20%igem Cyclodextrin als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.	1. Stunde		2. Stunde			3. Stunde			
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 364 / 2 ♀	3	3	3	6	3	6	6	3	6
/ 3 5	2	2	2	4	3	4	4	3	4
/4 5	2	2	2	3	2	3	3	2	4
/6 ♀	3	2	3	3	2	3	3	3	3
/7 ♀	3	2	3	6	3	6	6	3	6
/ 10 ♀	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	2,7	2,3	2,7	4,2	2,7	4,2	4,2	2,8	4,3
StdFehler	0,2	0,2	0,2	0,6	0,2	0,6	0,6	0,2	0,6
StdAbweichung	0,5	0,5	0,5	1,5	0,5	1,5	1,5	0,4	1,4

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on	I	Latency max					
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post			
dt 364 / 2 ♀	6	1	1	96		100			
/ 3 5	13	3	6						
/4 J	5	1	1						
/ 6 9	2	1	3						
/7 ♀	5	5 2 1 99		99		90			
/10 ♀	2	5	1						
Mittelwert	5,5	2,2	2,2	n.e.	n.e.	n.e.			
StdFehler	1,6	0,7	0,8	n.e.	n.e.	n.e.			
StdAbweichung	4,0	1,6	2,0	n.e.	n.e.	n.e.			

Tab. 2: Einmalige systemische Applikation (i.p.) von Tropicamid + Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 30 mg/kg + 15 mg/kg sowie 20%igem Cyclodextrin als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.		1. Stund	е	2	2. Stund	е	3. Stunde			
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	
dt 359 / 1 🕺 🖒	2	2	2	3	2	3	3	2	3	
/2 ♀	3	2	3	4	3	3	4	3	4	
dt 364 / 1 ♀	6	2	4	6	2	6	6	2	6	
/2 ♀	3	2	3	4	2	6	4	2	6	
/3 5	2	2	2	3	2	4	3	2	4	
/ 10 ♀	2	2	3	2	2	3	2	2	3	
Mittelwert	3,0	2,0	2,8	3,7	2,2	4,2	3,7	2,2	4,3	
StdFehler	0,6	0,0	0,3	0,6	0,2	0,6	0,6	0,2	0,6	
StdAbweichung	1,5	0,0	0,6	1,4	0,4	1,5	1,4	0,4	1,4	

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.			Latency on	l	Latency max				
		Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post		
dt 359 / 1	3	7	21	4					
/ 2	$\sum_{i=1}^{n}$	7	19	2					
dt 364 / 1	$\sum_{i=1}^{n}$	3	9	1	59		62		
/ 2	2	6	7	6			96		
/ 3	3	2	7	13					
/ 10	$\frac{1}{2}$	5	16	2					
Mittelwert		5,0 13,2		4,7	n.e.	n.e.	n.e.		
StdFehler		0,9	2,6	1,8	n.e.	n.e.	n.e.		
StdAbweichung		2,1	6,3	4,5	n.e.	n.e.	n.e.		

Tab. 3: Einmalige systemische Applikation (i.p.) von Tropicamid + Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 60 mg/kg + 30 mg/kg sowie 20%igem Cyclodextrin als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.		I. Stund	е	2	2. Stund	е	3. Stunde			
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	
dt 359 / 1 🛛 🖒	2	2	3	3	2	4	3	2	4	
/2 ♀	3	2	3	3	2	3	4	2	4	
dt 360 / 1 ♀	3	2	3	3	2	4	3	2	4	
/2	6	6	5	6	6	6	6	6	6	
/ 3	6	6	2	6	6	6	6	6	6	
dt 364 / 4 🖒	3	2	2	3	2	3	3	2	3	
18 5	3	2	2	3	2	2	3	2	2	
/9 🗘	3	2	2	3	2	2	4	3	2	
Mittelwert	3,6	3,0	2,8	3,8	3,0	3,8	4,0	3,1	3,9	
StdFehler	0,5	0,7	0,4	0,5	0,7	0,6	0,5	0,6	0,5	
StdAbweichung	1,5	1,9	1,0	1,4	1,9	1,6	1,3	1,8	1,6	

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on	I	Latency max				
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post		
dt 359 / 1 🕺 👌	4	10	10					
/2 ♀	2	23	7					
dt 360 / 1 ♀	3	19	4					
/2 ♀	3	14	4	51	24	76		
/ 3 ♀	2	10	0 2		26	76		
dt 364 / 4 🔗 👌	2	8	5					
/8 5	1	10	16					
/9 ♀	2	7	1					
Mittelwert	2,4	12,6	6,1	n.e.	n.e.	n.e.		
StdFehler	0,3	2,0	1,7	n.e.	n.e.	n.e.		
StdAbweichung	0,9	5,7	4,9	n.e.	n.e.	n.e.		

Tab. 4: Einmalige systemische Applikation (i.p.) von Pirenzepin in einer Dosierung von25 mg/kg sowie 0,9%igem NaCl als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.	,	I. Stund	е	2	2. Stund	е	3. Stunde			
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	
dt 368 / 8 🖒	3	2	2	3	2	2	3	2	2	
/9 5	3	3	4	3	4	4	3	4	4	
dt 369 / 2 🖒	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
dt 370 / 5 ♀	2	2	2	3	3	6	4	3	6	
dt 371 / 5 🖒	2	2	2	2	2	4	6	4	6	
/6 5	2	2	2	4	2	4	6	4	6	
dt 377 / 2 ♀	2	3	3	4	3	3	6	4	6	
/4 5	3	2	2	3	2	2	3	2	2	
Mittelwert	2,5	2,4	2,5	3,1	2,6	3,5	4,3	3,3	4,4	
StdFehler	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,5	0,5	0,3	0,7	
StdAbweichung	0,5	0,5	0,8	0,6	0,7	1,3	1,5	0,9	1,8	

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on	1	Latency max					
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post			
dt 368 / 8 🖒	4	4	2						
/9 5	2	1	1						
dt 369 / 2 🔗	6	5	7						
dt 370 / 5 ♀	7	5	1			91			
dt 371 / 5 🖒	20	8	6	154		130			
/6 5	20	20 10 13 157		157		150			
dt 377 / 2	6	8	5	155		179			
/4 5	2	6	2						
Mittelwert	8,4	5,9	4,6	n.e.	n.e.	n.e.			
StdFehler	2,6	1,0	1,5	n.e.	n.e.	n.e.			
StdAbweichung	7,4	2,8	4,1	n.e.	n.e.	n.e.			

Tab. 5: Einmalige systemische Applikation (i.p.) von Pirenzepin in einer Dosierung von50 mg/kg sowie 0,9%igem NaCl als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.		1. Stund	е	2	2. Stunde 3. St			3. Stunde				
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post			
dt 368 / 8 🖒	2	2	2	3	2	2	3	2	2			
/9 5	4	4	4	4	4	5	5	5	5			
dt 369 / 2 🖒	3	3	3	3	3	3	3	3	3			
dt 370 / 5 ♀	2	3	6	6	6	6	6	6	6			
dt 370 / 6 ♀	5	5	2	6	6	4	6	6	6			
dt 371 / 5 🖒	2	2	2	4	2	3	6	5	6			
/6 5	2	2	2	4	4	4	6	6	6			
dt 377 / 3	3	2	2	4	4	2	4	4	3			
Mittelwert	2,9	2,9	2,9	4,3	3,9	3,6	4,9	4,6	4,6			
StdFehler	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6			
StdAbweichung	1,1	1,1	1,5	1,2	1,6	1,4	1,4	1,5	1,7			

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on	l	l	_atency ma	x		
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post		
dt 368 / 8 🖒	10	4	13					
/9 ठे	15	2	1					
dt 369 / 2 🖒	7	3	6					
dt 370 / 5 ♀	1 2 4 91		91	81	53			
dt 370 / 6 ♀	4	4	2	101	85	127		
dt 371 / 5 🖒	6	2	12	130		168		
/6 3	13	3	5	150	171	141		
dt 377 / 3	4	4	5					
Mittelwert	7,5	3,0	6,0	n.e.	n.e.	n.e.		
StdFehler	1,7	0,3	1,5	n.e.	n.e.	n.e.		
StdAbweichung	4,8	0,9	4,3	n.e.	n.e.	n.e.		

- Tab. 6: Tägliche systemische Applikation (i.p.) von Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 20 mg/kg sowie 20%igem Cyclodextrin
- 1. Beobachtungsstunde

Substanz und Dosis	Trihexyphenidyl 20 mg/kg								NaCl 5 ml/kg								
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	2,0	2,0	2,1	2,0	2,3	2,0	2,0	2,0	2,3	2,7	2,7	2,9	2,9	2,9	2,3	2,0	2,0
S.E.	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,5	0,4	0,4
S.D.	0,0	0,0	0,4	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,7	0,4	0,4	1,3	1,0	1,0

Substanz und Dosis	Cyclodextrin 20 % 5 ml/kg									NaCl 5 ml/kg							
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	2,1	2,1	2,3	1,9	2,3	2,4	2,4	2,7	2,7	3,0	2,6	2,7	2,7	2,9	1,7	1,3	1,9
S.E.	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,5	0,3
S.D.	0,4	0,4	0,8	0,9	0,5	0,8	0,8	0,8	1,1	1,0	0,5	0,5	0,5	0,4	0,8	1,3	0,9
Substanz und Dosis				Trihe 2	exyphe 0 mg/k	nidyl g							Na 5 m	ıCl I/kg			
-------------------------	-----	-----	-----	------------	------------------	------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----------	-------------	-----	-----	-----
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	2,3	2,3	2,1	2,1	2,6	2,0	2,0	2,3	2,3	2,7	2,9	3,1	2,9	2,9	2,9	2,7	2,6
S.E.	0,2	0,3	0,1	0,1	0,3	0,0	0,0	0,2	0,2	0,2	0,1	0,5	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2
S.D.	0,5	0,8	0,4	0,4	0,8	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,4	1,3	0,4	0,4	0,9	0,5	0,5

Substanz und Dosis				Cyclo	dextrin 5 ml/kg	20 %							Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	2,4	2,4	2,6	2,1	2,7	2,7	3,3	3,6	3,1	3,1	2,7	2,7	2,7	3,1	2,6	2,1	2,1
S.E.	0,3	0,3	0,6	0,4	0,3	0,6	0,7	0,6	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,7	0,5	0,4
S.D.	0,8	0,8	1,5	1,1	0,8	1,5	1,9	1,7	1,5	1,3	0,8	0,5	0,5	0,7	1,9	1,2	1,1

Substanz und Dosis				Triho 2	exyphe 20 mg/k	nidyl g							Na 5 m	ıCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	3,4	2,3	2,3	2,1	2,6	2,0	2,3	2,7	2,4	3,3	3,4	3,1	3,0	3,6	3,0	2,7	2,7
S.E.	0,4	0,3	0,2	0,1	0,3	0,0	0,2	0,3	0,2	0,5	0,3	0,5	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2
S.D.	1,0	0,8	0,5	0,4	0,8	0,0	0,5	0,8	0,5	1,4	0,8	1,3	0,6	1,1	1,0	0,5	0,5

Substanz und Dosis				Cyclo	odextrin 5 ml/kg	20 %							Na 5 m	ıCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	22. 24. 27. 29. 31. 34. 36. 38.									45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	3,0	2,9	2,6	2,3	3,0	2,7	3,3	3,6	4,1	3,1	2,7	3,7	3,1	3,7	2,9	2,3	2,7
S.E.	0,3	0,6	0,6	0,5	0,5	0,6	0,7	0,6	0,7	0,5	0,3	0,6	0,5	0,6	0,9	0,5	0,7
S.D.	0,8	1,5	1,5	1,3	1,4	1,5	1,9	1,7	1,8	1,3	0,8	1,6	1,3	1,6	2,3	1,3	1,9

Tab. 7: Latenzzeit bis zum Auftreten erster dystoner Bewegungsstörungen von dtsz-Hamstern nach Behandlung mitTrihexyphenidyl (20 mg/kg) sowie 20%igem Cyclodextrin

Latenz

Substanz und Dosis				Triho 2	exyphe 20 mg/k	nidyl g							Na 5 m	aCI I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	4,0	3,7	4,4	3,6	7,4	4,7	4,9	4,7	6,0	5,3	6,3	5,0	6,1	6,9	33,1	35,9	30,0
S.E.	1,2	0,9	0,8	0,4	3,0	1,4	0,7	0,7	0,9	0,6	1,2	0,9	1,2	1,0	14,4	12,1	14,2
S.D.	3,2	2,3	2,1	1,1	7,9	3,8	1,8	1,8	2,4	1,5	3,1	2,4	3,1	2,6	38,1	32,0	37,5

Substanz und Dosis				Cyclo	odextrin 5 ml/kg	20 %							Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	3,6	5,1	6,1	3,6	5,6	8,1	7,3	5,6	4,6	5,0	8,6	6,3	7,7	6,6	37,4	65,9	39,7
S.E.	0,7	1,0	1,2	1,1	0,9	1,5	1,1	0,6	0,7	0,7	1,7	1,0	1,1	0,8	23,9	23,0	23,8
S.D.	1,8	2,5	3,3	2,9	2,4	3,9	2,8	1,6	1,9	1,9	4,4	2,8	2,9	2,0	63,1	60,9	63,0

Tab. 8: Tägliche systemische Applikation (i.p.) von Tropicamid + Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 30 + 15 mg/kg sowie20%igem Cyclodextrin

Substanz und Dosis			ן Tr	Fropica ihexypl	mid 30 nenidyl	mg/kg 15 mg/	+ kg						Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	25.	27.	29.	32.	34.	36.	39.	41.	43.	46.	48.	50.	53.	55.	57.	60.
M.W.	2,6	2,4	2,1	2,0	2,4	2,4	4,0	3,3	2,1	2,7	2,8	3,0	2,9	3,7	3,2	2,9	2,9
S.E.	0,2	0,2	0,1	0,0	0,2	0,2	0,6	0,4	0,3	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4
S.D.	0,7	0,7	0,3	0,0	0,5	0,5	1,7	1,1	0,9	0,5	1,1	1,1	1,1	1,2	1,0	1,1	1,2

Substanz und Dosis				Cyclo	dextrin 5 ml/kg	20 %							Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	25.	27.	29.	32.	34.	36.	39.	41.	43.	46.	48.	50.	53.	55.	57.	60.
M.W.	1,8	3,1	3,2	2,8	3,0	2,9	2,9	3,2	3,1	2,7	3,0	2,9	3,1	2,7	2,6	2,4	2,2
S.E.	0,4	0,4	0,4	0,1	0,0	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1
S.D.	1,1	1,2	1,1	0,4	0,0	0,3	0,6	0,8	0,8	1,0	1,3	0,6	0,9	0,7	0,5	0,5	0,4

Substanz und Dosis			ן Tr	Fropica ihexypl	mid 30 henidyl	mg/kg · 15 mg/	+ kg						Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	25.	27.	29.	32.	34.	36.	39.	41.	43.	46.	48.	50.	53.	55.	57.	60.
M.W.	3,0	3,1	2,9	2,9	3,2	3,1	5,0	4,4	3,4	3,8	3,7	4,2	4,1	4,7	4,0	4,2	3,7
S.E.	0,2	0,4	0,5	0,6	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
S.D.	0,5	1,3	1,4	1,8	1,2	1,3	1,6	1,5	1,3	1,6	1,7	1,9	1,5	1,6	1,5	1,5	1,7

Substanz und Dosis				Cyclo	dextrin 5 ml/kg	20 %							Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	25.	27.	29.	32.	34.	36.	39.	41.	43.	46.	48.	50.	53.	55.	57.	60.
M.W.	2,4	3,1	3,3	3,2	3,3	3,0	3,6	3,7	3,9	2,9	3,7	3,4	3,4	3,6	3,6	3,0	3,2
S.E.	0,4	0,4	0,3	0,4	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	0,3	0,5
S.D.	1,1	1,2	1,0	1,1	0,7	0,5	1,2	1,2	1,3	1,4	1,5	1,1	1,1	1,1	1,6	1,0	1,6

Substanz und Dosis			ר Tr	Fropica ihexypl	mid 30 henidyl	mg/kg · 15 mg/	+ kg						Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	25.	27.	29.	32.	34.	36.	39.	41.	43.	46.	48.	50.	53.	55.	57.	60.
M.W.	3,8	3,3	3,7	3,8	3,6	3,2	5,2	4,8	4,0	4,9	4,7	4,6	4,6	5,1	4,4	4,9	3,8
S.E.	0,3	0,4	0,5	0,6	0,4	0,4	0,4	0,5	0,6	0,4	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
S.D.	1,0	1,2	1,6	1,8	1,1	1,3	1,2	1,6	1,7	1,3	1,8	1,7	1,6	1,4	1,4	1,5	1,8

Substanz und Dosis				Cyclo	dextrin 5 ml/kg	1 20 %							Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	25.	27.	29.	32.	34.	36.	39.	41.	43.	46.	48.	50.	53.	55.	57.	60.
M.W.	2,7	3,1	3,3	3,7	3,4	3,0	4,1	4,0	3,9	3,8	4,3	4,6	4,2	4,2	3,9	3,6	3,8
S.E.	0,4	0,4	0,3	0,5	0,3	0,2	0,5	0,4	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6
S.D.	1,2	1,2	1,0	1,4	0,9	0,5	1,5	1,3	1,3	1,6	1,7	1,2	1,4	1,7	1,7	1,6	1,8

Tab. 9: Latenzzeit bis zum Auftreten erster dystoner Bewegungsstörungen von *dt^{sz}*-Hamstern nach Behandlung mitTropicamid + Trihexyphenidyl (30 + 15 mg/kg) sowie 20%igem Cyclodextrin

Latenz

Substanz und Dosis			ן Tr	Fropica ihexypl	mid 30 henidyl	mg/kg · 15 mg/	+ kg						Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	25.	27.	29.	32.	34.	36.	39.	41.	43.	46.	48.	50.	53.	55.	57.	60.
M.W.	16,3	3,0	6,1	4,0	3,2	4,2	3,3	4,8	18,7	8,3	2,2	5,3	3,4	6,9	4,0	4,0	2,8
S.E.	6,0	1,5	1,2	1,1	0,3	1,3	1,2	0,8	11,1	2,4	0,6	0,9	0,6	2,9	0,8	0,6	0,6
S.D.	18,1	4,4	3,7	3,4	1,0	3,9	3,6	2,5	33,2	7,2	1,7	2,6	1,9	8,8	2,3	1,7	1,7

Substanz und Dosis				Cyclo	odextrin 5 ml/kg	20 %							Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	25.	27.	29.	32.	34.	36.	39.	41.	43.	46.	48.	50.	53.	55.	57.	60.
M.W.	38,9	2,4	7,1	6,1	4,2	7,0	3,3	3,8	5,8	6,7	4,8	4,1	3,4	3,3	3,8	3,2	4,2
S.E.	19,4	0,6	0,9	1,6	0,6	1,8	0,7	0,8	0,9	1,8	1,6	0,7	0,9	0,8	1,1	0,6	0,7
S.D.	58,2	1,9	2,6	4,8	1,8	5,4	2,2	2,3	2,8	5,3	4,7	2,0	2,8	2,4	3,2	1,9	2,2

 Tab. 10: Tägliche systemische Applikation (i.p.) von Pirenzepin in einer Dosierung von 25 mg/kg sowie 0,9% igem NaCl

Substanz und Dosis				Pi 2	irenzep 5 mg/k	in g							Na 5 m	iCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	2,2	2,7	2,2	2,0	2,5	2,8	3,0	2,8	3,0	3,3	2,5	2,7	2,8	2,8	2,7	3,0	2,8
S.E.	0,2	0,2	0,2	0,0	0,2	0,7	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,0	0,2
S.D.	0,4	0,5	0,4	0,0	0,5	1,6	0,6	0,4	0,6	0,8	0,5	0,5	0,4	0,8	0,5	0,0	0,4

Substanz und Dosis									NaCl 5 ml/kg								
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	2,2	2,3	2,5	2,7	2,5	2,3	2,7	2,7	2,8	3,0	3,0	2,8	3,2	3,2	3,0	3,3	3,5
S.E.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	0,0	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3
S.D.	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,0	0,0	0,4	0,4	0,4	1,1	0,8	0,8

Substanz und Dosis				P 2	irenzep 25 mg/k	in g							Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	2,7	2,8	2,2	2,7	2,5	3,0	3,0	3,3	3,2	4,0	3,2	4,2	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
S.E.	0,2	0,3	0,2	0,7	0,2	0,6	0,3	0,6	0,4	0,6	0,6	0,6	0,5	0,7	0,5	0,5	0,6
S.D.	0,5	0,8	0,4	1,6	0,5	1,5	0,6	1,4	1,0	1,5	1,5	1,5	1,2	1,6	1,2	1,2	1,4

Substanz und Dosis									NaCl 5 ml/kg								
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	2,3	2,5	2,7	3,0	2,7	2,5	2,7	2,7	2,8	3,0	3,2	3,7	3,8	3,3	3,5	3,3	3,7
S.E.	0,2	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	0,2	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5
S.D.	0,5	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,0	0,4	1,2	1,3	0,8	0,8	0,8	1,2

3. Beobachtungsstunde

Substanz und Dosis				P 2	irenzep 5 mg/k	in g							Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	3,0	2,8	2,2	2,7	2,5	3,0	3,2	3,3	3,8	4,0	3,5	4,3	3,7	4,3	4,2	4,0	3,5
S.E.	0,4	0,3	0,2	0,7	0,2	0,6	0,2	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6	0,5	0,8	0,6	0,6	0,6
S.D.	0,9	0,8	0,4	1,6	0,5	1,5	0,4	1,4	1,7	1,5	1,5	1,4	1,2	1,9	1,5	1,5	1,4

Substanz und Dosis									NaCl 5 ml/kg								
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	3,0	2,5	2,7	3,0	2,7	2,5	2,7	2,7	2,8	3,0	3,8	3,8	4,0	3,5	3,7	4,0	3,8
S.E.	0,4	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,6	0,5
S.D.	1,1	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,0	1,2	1,3	1,3	0,8	1,2	1,5	1,2

246

Tab. 11: Latenzzeit bis zum Auftreten erster dystoner Bewegungsstörungen von *dtsz*-Hamstern nach Behandlung mitPirenzepin (25 mg/kg) sowie 0,9%igem NaCl

Latenz

Substanz und Dosis				Pi 2	irenzep 25 mg/k	in g							Na 5 m	aCl I/kg			
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	3,7	3,8	5,5	3,5	5,0	6,7	12,7	6,8	5,5	7,0	6,5	9,3	6,5	6,3	6,8	7,7	9,8
S.E.	0,2	0,6	1,1	0,4	1,0	1,0	2,2	0,9	0,6	3,5	0,7	1,8	0,9	0,6	0,9	1,4	0,8
S.D.	0,5	1,5	2,6	1,0	2,4	2,5	5,5	2,2	1,4	1,4	1,8	4,3	2,2	1,6	2,3	3,4	1,9

Substanz und Dosis									NaCl 5 ml/kg								
Lebensalter in Tagen	22.	24.	27.	29.	31.	34.	36.	38.	41.	43.	45.	48.	50.	52.	55.	57.	59.
M.W.	4,3	8,5	4,8	3,0	6,3	6,2	11,3	7,2	6,7	5,0	6,5	8,8	5,5	7,8	6,0	8,0	7,2
S.E.	0,6	3,1	0,7	0,5	1,2	1,0	1,6	1,1	1,3	1,1	0,7	1,5	1,2	1,4	0,5	1,4	0,9
S.D.	1,4	7,5	1,6	1,3	3,0	2,4	4,0	2,7	3,1	2,7	1,6	3,6	3,0	3,4	1,3	3,4	2,1

Tab 12: Striatale Mikroinjektion von Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 200 ng/ 0,5 μl/Hemisphäre sowie 0,5 μl/Hemisphäre Cyclodextrin (10%) als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.	,	1. Stund	е	2	2. Stund	е	÷	3. Stund	е
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 393 / 5 ♀	2	2	3	2	2	3	2	2	3
/6 ♂	2	3	2	2	3	2	2	3	2
dt 395 / 1 ♀	2	3	3	2	3	3	2	3	3
dt 397 / 2 ♀	3	3	3	3	3	3	3	3	3
19 5	3	2	3	4	3	4	6	4	4
/ 10 9	2	3	2	2	6	3	2	6	3
dt 398 / 1 🔗	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	2,4	2,7	2,7	2,6	3,3	3,0	2,9	3,4	3,0
StdFehler	0,2	0,2	0,2	0,3	0,5	0,2	0,6	0,5	0,2
StdAbweichung	0,5	0,5	0,5	0,8	1,3	0,6	1,5	1,3	0,6

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on	l	l	_atency ma	x
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 393 / 5	5	8	6			
/6 ♂	14	17	7			
dt 395 / 1 🛛 🖓	6	7	28			
dt 397 / 2	17	14	10			
/9 ठे	18	2	5	141		
/ 10 🛛 🌳	7	10	10		96	
dt 398 / 1 🕺 🖒	9	12	14			
Mittelwert	10,9	10,0	11,4	n.e.	n.e.	n.e.
StdFehler	2,0	1,9	3,0	n.e.	n.e.	n.e.
StdAbweichung	5,4	4,9	7,9	n.e.	n.e.	n.e.

Tab 13: Striatale Mikroinjektion von Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 400 ng/ 0,5 μl/Hemisphäre sowie 0,5 μl/Hemisphäre Cyclodextrin (10%) als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.		1. Stunde			2. Stunde			3. Stunde		
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	
dt 395 / 3 🖒	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
dt 397 / 3 🖒	2	3	3	3	3	3	3	3	3	
/8 4	2	2	2	6	2	6	6	2	6	
dt 399 / 3 🖒	6	3	4	6	3	6	6	3	6	
dt 401 / 1 🛛 🖓	2	2	3	6	6	3	6	6	4	
dt 402 / 4	2	3	3	4	6	4	4	6	4	
dt 401 / 7 🖒	3	3	2	6	3	4	6	3	6	
Mittelwert	2,7	2,6	2,7	4,7	3,6	4,0	4,7	3,6	4,4	
StdFehler	0,6	0,2	0,3	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	
StdAbweichung	1,5	0,5	0,8	1,7	1,7	1,5	1,7	1,7	1,6	

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on		L	_atency ma	x
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 395 / 3 🖒	8	12	15			
dt 397 / 3 🕺 👌	11	16	10			
/8 ♀	12	19	18	88		90
dt 399 / 3 🕺 🖒	8	14	14	51		92
dt 401 / 1 ♀	8	1	4	80	80	
dt 402 / 4 ♀	14	15	19		90	
dt 401 / 7 🔥	14	19	21	115		121
Mittelwert	10,7	13,7	14,4	n.e.	n.e.	n.e.
StdFehler	1,0	2,3	2,2	n.e.	n.e.	n.e.
StdAbweichung	2,8	6,2	5,9	n.e.	n.e.	n.e.

Tab 14: Striatale Mikroinjektion von Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 800 ng/ 0,5 μl/Hemisphäre sowie 0,5 μl/Hemisphäre Cyclodextrin (10%) als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.		1. Stunde 2. Stunde 3. Stunde			2. Stunde			е	
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 395 / 4 🖒	3	3	2	3	3	2	3	3	2
dt 397 / 5 ♀	3	2	2	3	2	2	3	3	2
/7 ♀	3	3	3	6	6	6	6	6	6
dt 398 / 3 ♀	3	3	3	3	3	3	3	3	3
dt 399 / 4 🖒	2	3	2	2	3	3	2	3	4
/5 ♀	6	3	3	6	6	6	6	6	6
dt 402 / 1 ♀	3	2	2	6	2	6	6	2	6
Mittelwert	3,3	2,7	2,4	4,1	3,6	4,0	4,1	3,7	4,1
StdFehler	0,5	0,2	0,2	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6	0,7
StdAbweichung	1,3	0,5	0,5	1,8	1,7	1,9	1,8	1,6	1,9

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on	l	L	_atency ma	x
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 395 / 4 🖒	9	9	13			
dt 397 / 5 ♀	8	4	13			
/7 ♀	8	12	14	82	92	120
dt 398 / 3	18	13	13			
dt 399 / 4 🖒	7	3	8			
/ 5	9	7	13	43		106
dt 402 / 1 ♀	13	15	14	71		116
Mittelwert	10,3	9,0	12,6	n.e.	n.e.	n.e.
StdFehler	1,5	1,7	0,8	n.e.	n.e.	n.e.
StdAbweichung	3,9	4,6	2,1	n.e.	n.e.	n.e.

Tab 15: Striatale Mikroinjektion von Tropicamid + Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 200 ng + 200 ng/0,5 μl/Hemisphäre sowie 0,5 μl/Hemisphäre Cyclodextrin (10%) als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.		1. Stund	е	:	2. Stund	е	3. Stunde		
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 395 / 3 👌	2	3	3	2	3	3	2	3	3
dt 397 / 2 ♀	3	3	3	3	3	3	3	3	3
/ 5	2	2	2	2	2	2	2	2	2
/9 ठे	3	3	3	4	3	6	4	3	6
dt 398 / 2 🕺 🖒	3	2	2	3	2	2	3	2	2
dt 402 / 4 ♀	3	3	3	4	6	6	4	6	6
Mittelwert	2,7	2,7	2,7	3,0	3,2	3,7	3,0	3,2	3,7
StdFehler	0,2	0,2	0,2	0,4	0,6	0,8	0,4	0,6	0,8
StdAbweichung	0,5	0,5	0,5	0,9	1,5	1,9	0,9	1,5	1,9

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on	l	L	_atency ma	x
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 395 / 3 🖒	15	12	12			
dt 397 / 2 ♀	10	17	18			
/ 5	13	9	12			
/9 5	5	9	3			75
dt 398 / 2 🖒	15	6	5			
dt 402 / 4 ♀	19	14	15		101	76
Mittelwert	12,8	11,2	10,8	n.e.	n.e.	n.e.
StdFehler	2,0	1,6	2,4	n.e.	n.e.	n.e.
StdAbweichung	4,8	4,0	5,8	n.e.	n.e.	n.e.

Tab 16: Striatale Mikroinjektion von Tropicamid + Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 400 ng + 400 ng/0,5 μl/Hemisphäre sowie 0,5 μl/Hemisphäre Cyclodextrin (10%) als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.		1. Stund	е	2	2. Stunde			3. Stunde	
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 395 / 1 ♀	3	3	2	3	3	2	3	3	3
/4 5	2	2	3	2	2	3	2	3	3
dt 397 / 3 🖒	3	3	3	3	3	3	3	3	3
/7 ♀	3	3	3	6	4	6	6	5	6
dt 398 / 3 ♀	3	3	2	3	3	2	3	3	2
dt 399 / 3 🖒	3	2	4	6	3	4	6	3	6
/5 ♀	4	3	5	6	5	6	6	6	6
dt 401 / 1 ♀	3	2	3	3	6	3	4	6	6
dt 402 / 2 ♀	3	3	3	6	4	6	6	6	6
Mittelwert	3,0	2,7	3,1	4,2	3,7	3,9	4,3	4,2	4,6
StdFehler	0,2	0,2	0,3	0,6	0,4	0,6	0,6	0,5	0,6
StdAbweichung	0,5	0,5	0,9	1,7	1,2	1,7	1,7	1,5	1,7

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on		Latency max			
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	
dt 395 / 1	28	17	13				
/4 5	13	1	6				
dt 397 / 3 🕺 🖒	10	10	5				
/7 ♀	14	13	2	120		115	
dt 398 / 3 ♀	13	21	8				
dt 399 / 3 🛛 💍	7	32	16	75		161	
/5 ♀	7	10	16	95	160	109	
dt 401 / 1 ♀	4	6	3		86	130	
dt 402 / 2 ♀	11	15	13	112	121	106	
Mittelwert	11,9	13,9	9,1	n.e.	n.e.	n.e.	
StdFehler	2,3	3,0	1,8	n.e.	n.e.	n.e.	
StdAbweichung	6,9	9,0	5,5	n.e.	n.e.	n.e.	

Tab 17: Striatale Mikroinjektion von Tropicamid + Trihexyphenidyl in einer Dosierung von 800 ng + 800 ng/0,5 μl/Hemisphäre sowie 0,5 μl/Hemisphäre Cyclodextrin (10%) als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.	,	I. Stund	е	2	2. Stund	е	3	3. Stund	е
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 397 / 8 ♀	2	2	3	6	3	3	6	3	6
/ 10 🛛 🌳	2	2	2	3	3	2	3	3	2
/ 11 9	3	2	3	6	3	3	6	3	6
dt 398 / 1 🔗	3	3	3	3	3	3	3	3	3
dt 399 / 3 🖒	4	2	3	6	6	6	6	6	6
/4 5	2	3	3	3	3	4	4	4	4
/5 ♀	3	4	4	6	6	6	6	6	6
dt 401 / 2 🖒	2	2	3	4	4	4	6	6	6
Mittelwert	2,6	2,5	3,0	4,6	3,9	3,9	5,0	4,3	4,9
StdFehler	0,3	0,3	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
StdAbweichung	0,7	0,8	0,5	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5	1,6

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on	l	l	_atency ma	x
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 397 / 8 ♀	18	7	17	90		155
/ 10 ♀	10	9	13			
/ 11 ♀	14	13	9	95		123
dt 398 / 1 🕺 👌	14	9	11			
dt 399 / 3 🖒	14	8	7	92	75	75
/4 5	8	7	6			
/ 5	13	7	7	106	107	95
dt 401 / 2 👌	14	13	24	165	167	167
Mittelwert	13,1	9,1	11,8	n.e.	n.e.	n.e.
StdFehler	1,1	0,9	2,2	n.e.	n.e.	n.e.
StdAbweichung	3,0	2,5	6,2	n.e.	n.e.	n.e.

Tab 18: Striatale Mikroinjektion von VU0152100 in einer Dosierung von 0,125 ng/0,5 μl/ Hemisphäre sowie 0,5 μl/Hemisphäre DMSO (5%) als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.	,	I. Stund	е	2. Stunde			3. Stunde		
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 404 / 3	2	3	2	2	3	3	3	4	3
/5 ♀	3	3	3	3	3	3	3	3	3
dt 408 / 4 ♀	3	2	2	3	2	2	3	2	2
/7 ♀	2	2	2	2	2	2	2	2	2
/8 4	2	2	2	2	2	2	2	2	2
/ 10 👌	2	4	2	4	6	2	4	6	2
Mittelwert	2,3	2,7	2,2	2,7	3,0	2,3	2,8	3,2	2,3
StdFehler	0,2	0,3	0,2	0,3	0,6	0,2	0,3	0,7	0,2
StdAbweichung	0,5	0,8	0,4	0,8	1,5	0,5	0,8	1,6	0,5

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on	I	L	_atency ma	x
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 404 / 3	6	6	2			
/5 🗘	6	6	7			
dt 408 / 4 ♀	7	6	5			
/7 ♀	7	8	14			
/ 8 9	7	6	4			
/ 10 👌	4	6	8		62	
Mittelwert	6,2	6,3	6,7	n.e.	n.e.	n.e.
StdFehler	0,5	0,3	1,7	n.e.	n.e.	n.e.
StdAbweichung	1,2	0,8	4,2	n.e.	n.e.	n.e.

Tab 19: Striatale Mikroinjektion von VU0152100 in einer Dosierung von 12,5 ng/0,5 μl/ Hemisphäre sowie 0,5 μl/Hemisphäre DMSO (5%) als Vor- und Nachkontrolle

Käfig-/Tier-Nr.	1	I. Stund	е	2. Stunde			3	3. Stund	е
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 404 / 2 ♀	2	2	2	2	6	2	2	6	2
/3 ♀	2	2	2	2	2	2	2	2	2
/5 ♀	2	2	2	2	2	3	3	2	3
dt 408 / 7 ♀	2	2	3	2	2	3	2	2	3
/ 8 4	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mittelwert	2,0	2,0	2,2	2,0	2,8	2,4	2,2	2,8	2,4
StdFehler	0,0	0,0	0,2	0,0	0,8	0,2	0,2	0,8	0,2
StdAbweichung	0,0	0,0	0,4	0,0	1,8	0,5	0,4	1,8	0,5

A: Stadien

Käfig-/Tier-Nr.		Latency on		l	Drug Post 76 n.e. n.e. n.e. n.e.	
	Pre	Drug	Post	Pre	Drug	Post
dt 404 / 2 ♀	20	6	8		76	
/ 3	7	6	7			
/ 5	8	8	4			
dt 408 / 7 ♀	14	9	6			
/ 8 9	4	2	1			
Mittelwert	10,6	6,2	5,2	n.e.	n.e.	n.e.
StdFehler	2,9	1,2	1,2	n.e.	n.e.	n.e.
StdAbweichung	6,4	2,7	2,8	n.e.	n.e.	n.e.

Gemeinsame Legende für die Tabellen 20 bis 26

In den aufgeführten Tabellen ist eine Übersicht zu Median, Perzentilen (25./75.), arithmetischem Mittelwert (M.W.), Standardfehler (S.E.) sowie dem Minimal- und Maximalwert (Min-Max) der Untersuchungen zum motorischen Verhalten im DYT1-Mausmodell dargestellt. Die verwendeten Dosierungen, die Art der Applikation, die Zuordnung zu den einzelnen Gruppen sowie die jeweiligen Tests zur Überprüfung der Motorik befinden sich in den Überschriften bzw. in den Tabellen.

Beim Score-System wurden die einzelnen Parameter, die ein Tier im Beobachtungszeitraum erreicht hat, addiert, sodass jeweils der in der Substanz- bzw. Vehikelkontrolle erreichte Maximalwert angegeben ist.

Nähere Erläuterungen zu den einzelnen Untersuchungen, der Gruppengröße sowie der verwendeten Methoden sind dem Kap. 3 zu entnehmen.

Signifikante Unterschiede, die sich aus der statistischen Auswertung ergaben, sind in Kap. 4 graphisch dargestellt.

			Activit	y Cage		Pilocarp	in-Score
		Anzahl Tr	ansitions	Anzahl F	Rearings		
		DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp
Pilocarpin 75 mg		-		-			
Mahilaal	Median (25. / 75.)	415 (382 / 508)	527 (417 / 705)	15,0 (10,0 / 20,0)	14,0 (10,5 / 22,5)	0,00 (0,00 / 0,00)	0,00 (0,00 / 1,00)
venikei	M.W.±S.E.	436 ± 23,9	566 ± 67,7	15,1 ± 1,84	16,4 ±3,82	0,29 ± 0,29	0,33 ± 0,17
	Min-Max	380 - 540	301 - 958	10,0 - 21,0	0,00 - 41,0	0,00 - 2,00	0,00 - 1,00
Pilocarnin	Median (25. / 75.)	494 (431 / 814)	546 (397 ± 810)	4,00 (0,00 / 8,00)	6,00 (1,00 / 10,5)	3,00 (2,00 / 4,00)	2,00 (1,50 / 3,50)
riocarpin	M.W.±S.E.	571 ± 94,8	601 ± 93,5	4,43 ± 1,88	5,89 ± 1,61	2,86 ± 0,34	2,26 ± 0,58
	Min-Max	269 - 999	213 - 1124	0,00 - 13,0	0,00 - 12,0	2,00 - 4,00	0,00 - 6,00
Pilocarpin 100 mg	9						
Vahikal	Median (25. / 75.)	606 (573 / 793)	814 (757 / 933)	22,0 (10,5 / 33,0)	29,5 (26,0 / 37,3)	0,00 (0,00 / 0,00)	0,00 (0,00 / 0,00)
venikei	M.W.±S.E.	653 ± 52,3	829 ± 32,4	21,7 ± 4,33	29,6 ± 3,89	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,20
	Min-Max	392 – 917	661 – 998	1,00 - 38,0	0,00 - 46,00	0,00 - 0,00	0,00 - 2,00
Dilocorpin	Median (25. / 75.)	424 (269 / 735)	604 (397 / 864)	0,00 (0,00 / 6,50)	2,00 (0,00 / 9,25)	4,00 (2,00 / 6,00)	3,00 (1,00 / 4,25)
Filocalpin	M.W.±S.E.	490 ± 78,4	635 ± 84,5	2,89 ± 1,59	5,60 ± 2,74	4,00± 0,71	3,20 ± 0,61
	Min-Max	222 - 815	295 - 1120	0,00 - 13,0	0,00 - 24,0	1,00 – 7,00	1,00 – 7,00
Pilocarpin 125 mg	3						
Vabikal	Median (25. / 75.)	366 (330 / 398)	466 (339 / 513)	10,0 (5,00 / 15,0)	14,0 (6,50 / 19,0)	0,00 (0,00 / 0,00)	0,00 (0,00 / 0,00)
venikei	M.W.±S.E.	374 ± 41,4	474 ± 66,1	10,6 ± 2,11	15,1 ± 4,11	0,00 ± 0,00	$0,00 \pm 0,00$
	Min-Max	202 - 573	268 - 946	3,00 - 19,0	0,00 - 43,0	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00
Pilocarpin	Median (25. / 75.)	164 (107 / 282)	196 (158 / 263)	0,00 (0,00 / 0,00)	0,00 (0,00 / 0,50)	3,00 (3,00 / 6,00)	5,00 (3,00 / 6,00)
Filocalpill	M.W.±S.E.	195 ± 50,9	205 ± 29,2	2,57 ± 2,57	0,33 ± 0,24	4,00 ± 0,62	4,78 ± 0,52
	Min-Max	0.00 - 417	51,0 - 355	0,00 - 18,00	0,00 - 2,00	2,00 - 6,00	3,00 - 7,00

Tab. 20: Tabellarische Übersicht zum Activity Cage und Pilocarpin-Score nach akut systemischer Applikation von 75, 100 und 125 mg/kg Pilocarpin

		Rota "Latency f	arod to fall" (s)	Grip-stre Griffstä	ngth Test arke (g)	Wire-hang "Latency t	Test 180° to fall" (s)
		DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp
Pilocarpin 75 mg							
Vabikal	Median (25. / 75.)	300 (300 / 300)	300 (242 / 300)	552 (531 / 575)	532 (406 / 686)	60,0 (60,0 / 60,0)	60,0 (60,0 / 60,0)
venikei	M.W.±S.E.	298 ± 2,00	274 ± 17,4	583 ± 47,8	539 ± 47,0	60,0 ± 0,00	60,0 ± 0,00
	Min-Max	286 - 300	180 - 300	470 - 860	356 - 744	60,0 - 60,0	60,0 - 60,0
Pilocarpin	Median (25. / 75.)	293 (251 / 300)	262 (221 / 300)	436 (414 / 540)	429 (339 / 526)	60,0 (60,0 / 60,0)	60,0 (60,0 / 60,0)
Filocalpin	M.W.±S.E.	280 ± 10,7	261 ± 13,8	465 ± 39,1	448 ± 42,9	60,0 ± 0,00	56,1 ± 3,89
	Min-Max	229 - 300	197 - 300	320 - 645	327 - 720	60,0 - 60,0	25,0 - 60,0
Pilocarpin 100 mg							
Vabikal	Median (25. / 75.)	300 (282 / 300)	300 (293 / 300)	386 (368 / 490)	466 (312 / 576)	60,0 (60,0 / 60,0)	60,0 (60,0 / 60,0)
venikei	M.W.±S.E.	278 ± 17,5	293 ± 5,37	438 ± 37,5	457 ± 42,9	60,0 ± 0,00	60,0 ± 0,00
	Min-Max	142 - 300	246 - 300	341 – 702	257 - 635	60,0 - 60,0	60,0 - 60,0
Pilocarpin	Median (25. / 75.)	274 (192 / 300)	300 (220 / 300)	500 (289 / 578)	525 (429 / 651)	60,0 (60,0 / 60,0)	60,0 (60,0 / 60,0)
	M.W.±S.E.	256 ± 17,6	258 ± 23,7	442 ± 56,6	533 ± 51,9	60,0 ± 0,00	57,7 ± 2,30
	Min-Max	179 - 300	106 - 300	117 - 605	247 - 791	60,0 - 60,0	37,0 - 60,0
Pilocarpin 125 mg	I						
Vabikal	Median (25. / 75.)	300 (300 / 300)	300 (300 / 300)	477 (275 / 549)	509 (422 / 609)	60,0 (60,0 / 60,0)	60,0 (60,0 / 60,0)
Venikei	M.W.±S.E.	294 ± 5,86	$300 \pm 0,00$	432 ± 49,6	521 ± 34,8	60,0 ± 0,00	60,0 ± 0,00
	Min-Max	259 – 300	300 - 300	238 - 573	379 - 678	60,0 - 60,0	60,0 - 60,0
Pilocarpin	Median (25. / 75.)	202 (113 / 223)	167 (113 / 213)	459 (387 / 598)	575 (399 / 650)	60,0 (60,0 / 60,0)	60,0 (60,0 / 60,0)
Filocalpili	M.W.±S.E.	187 ± 21,6	168 ± 21,0	483 ± 50,1	518 ± 56,2	60,0 ± 0,00	60,0 ± 0,00
	Min-Max	105 - 260	87,0 - 285	345 - 717	176 - 691	60,0 - 60,0	60,0 - 60,0

Tab. 21: Tabellarische Übersicht zum Rotarod und der neuromuskulären Kraft nach akut systemischer Applikation von 75, 100 und 125 mg/kg Pilocarpin

			Schrittlänge Vo	rderpfoten (cm))		Schrittlänge Hi	nterpfoten (cm)	
Foot	print	lin	ks	rec	hts	lin	ks	rec	hts
		DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp
Pilocarpin 75 r	ng								
	Median	6,80	6,80	6,50	6,70	6,50	6,80	6,40	6,60
Vehikel	(25. / 75.)	(6,50 / 6,80)	(6,15 / 7,85)	(6,00 / 6,80)	(5,90 / 7,40)	(6,30 / 6,80)	(5,95 / 7,80)	(6,10 / 6,70)	(5,60 / 7,50)
	M.W.±S.E.	6,67 ± 0,09	6,93	6,47 ± 0,15	6,66 ± 0,28	6,57 ± 0,13	6,83 ± 0,35	6,40 ± 0,12	6,59 ± 0,33
	Min-Max	6,30 – 7,00	5,50 - 8,30	5,90 - 7,00	5,40 - 7,90	6,10 – 7,10	5,40 - 8,40	5,90 - 6,80	5,30 – 7,90
	Median	6,20	6,60	6,20	6,20	6,20	6,40	6,10	6,30
Pilocarpin	(25. / 75.)	(6,10 / 6,40)	(5,55 / 6,85)	(6,10 / 6,50)	(5,35 ± 6,90)	(5,90 / 6,20)	(5,35 / 6,80)	(5,90 / 6,50)	(5,30 / 6,85)
	M.W.±S.E.	6,17 ± 0,11	6,26 ± 0,23	6,19 ± 0,13	6,19 ± 0,25	6,10 ± 0,11	6,17 ± 0,25	6,14 ± 0,17	6,14 ± 0,25
	Min-Max	5,60 - 6,50	5,20 - 6,90	5,50 - 6,50	5,20 - 7,00	5,60 - 6,50	5,10 – 7,00	5,30 - 6,60	5,20 – 7,00
Pilocarpin 100	mg								
	Median	6,10	6,55	6,20	6,40	6,00	6,30	6,00	6,35
Vehikel	(25. / 75.)	(5,65 / 6,75)	(6,15 / 6,80)	(5,90 / 6,90)	(6,18 / 6,75)	(5,65 / 6,70)	(6,08 / 6,73)	(5,90 / 6,95)	(5,90 / 6,63)
	M.W.±S.E.	6,10 ± 0,23	6,49 ± 0,15	6,27 ± 0,27	6,47 ± 0,11	6,02 ± 0,23	6,42 ± 0,14	6,31 ± 0,26	6,32 ± 0,13
	Min-Max	4,80 - 6,90	5,70 – 7,20	4,60 - 7,40	6,00 – 7,10	4,60 - 6,80	6,00 – 7,40	5,00 - 7,60	5,70 – 7,00
	Median	5,20	5,85	5,30	5,75	5,30	5,85	5,40	5,65
Pilocarpin	(25. / 75.)	(5,00 / 5,80)	(5,43 / 6,25)	(5,05 / 5,70)	(5,58 / 6,15)	(5,10 / 5,90)	(5,43 / 6,38)	(5,05 / 5,50)	(5,33 / 5,98)
•	M.W.±S.E.	5,32 ± 0,15	5,83 ± 0,20	5,37 ± 0,13	5,78 ± 0,13	5,48 ± 0,14	5,82 ± 0,21	5,23 ± 0,11	5,65 ± 0,13
	Min-Max	4,60 – 5,90	4,90 – 6,90	4,70 – 5,90	4,90 – 6,30	5,00 – 6,10	4,60 – 6,90	4,50 – 5,5	5,00 – 6,30
Pilocarpin 125	mg								
	Median	6,80	6,80	6,60	6,90	6,90	6,80	6,50	7,00
Vehikel	(25. / 75.)	(6,70 / 7,50)	(6,45 / 7,65)	(6,50 / 7,80)	(6,45 / 7,55)	(6,50 / 7,50)	(6,05 / 7,55)	(6,20 / 7,90)	(6,45 / 7,50)
	M.W.±S.E.	6,99 ± 0,25	6,98 ± 0,27	6,94 ± 0,30	7,01 ± 0,22	7,06 ± 0,26	6,87 ± 0,28	6,97 ± 0,37	6,96 ± 0,20
	Min-Max	5,90 - 7,90	5,80 - 8,30	5,80 - 7,90	6,20 – 8,10	6,10 – 8,20	5,90 - 8,30	5,90 - 8,50	6,20 – 7,90
	Median	6,30	6,10	6,30	6,10	6,30	6,20	6,40	6,10
Pilocarpin	(25. / 75.)	(5,70 / 6,50)	(5,75 / 6,45)	(5,60 / 6,50)	(5,65 / 6,55)	(5,70 / 6,50)	(5,85 / 6,45)	(5,50 / 6,60)	(5,50 / 6,40)
	M.W.±S.E.	6,09 ± 0,18	6,14 ± 0,17	6,14 ± 0,15	6,08 ± 0,16	6,14 ± 0,16	6,17 ± 0,15	6,14 ± 0,21	6,01 ± 0,18
	Min-Max	5,40 - 6,50	5,40 – 7,00	5,60 – 6,60	5,30 – 6,70	5,70 – 6,60	5,30 – 6,90	5,40 – 6,80	5,20 – 6,90

Tab. 22: Tabellarische Übersicht zum Footprint nach akut systemischer Applikation von 75, 100 und 125 mg/kg Pilocarpin

		Abstan	d Vorder- und I	Hinterfußabdruc	ck (cm)	Abstand Vord	erpfoten (cm)	Abstand Hinte	rpfoten (cm)
Foot	orint	lin	ks	rec	hts				
		DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp
Pilocarpin 75 r	ng								
	Median	0,50	0,60	0,50	0,40	1,40	1,30	2,20	2,20
Vehikel	(25. / 75.)	(0,40 / 0,60)	(0,40 / 0,70)	(0,40 / 0,70)	(0,35 / 0,60)	(1,30 / 1,50)	(1,25 / 1,60)	(2,00 / 2,50)	(1,95 / 2,25)
Verliker	M.W.±S.E.	0,50 ± 0,06	0,54 ± 0,06	0,53 ± 0,07	$0,49 \pm 0,07$	1,40 ± 0,06	1,39 ± 0,06	2,24 ± 0,08	2,16 ± 0,07
	Min-Max	0,30 - 0,80	0,20 - 0,70	0,20 - 0,80	0,30 - 0,90	1,10 – 1,60	1,20 – 1,60	2,00 - 2,50	1,90 - 2,60
	Median	0,30	0,50	0,40	0,40	1,30	1,30	1,90	2,20
Pilocarnin	(25. / 75.)	(0,20 / 0,60)	(0,35 / 0,80)	(0,20 / 0,50)	(0,25 / 0,55)	(1,10 / 1,40)	(1,20 / 1,40)	(1,70 / 2,00)	(1,85 / 2,35)
r noourphi	M.W.±S.E.	0,40 ± 0,08	0,56 ± 0,09	0,34 ± 0,053	0,43 ± 0,07	1,23 ± 0,06	1,29 ± 0,04	1,84 ± 0,12	2,13 ± 0,11
	Min-Max	0,20 - 0,80	0,20 - 1,00	0,20 - 0,50	0,20- 0,90	1,00 – 1,40	1,10 – 1,50	1,20 – 2,20	1,60 – 2,50
Pilocarpin 100	mg								
	Median	0,40	0,50	0,50	0,55	1,40	1,35	2,20	2,15
Vehikel	(25. / 75.)	(0,35 / 0,65)	(0,30 / 0,60)	(0,30 / 0,55)	(0,35 / 0,73)	(1,30 / 1,55)	(1,28 / 1,43)	(2,05 / 2,30)	(2,00 / 2,43)
Verliker	M.W.±S.E.	0,49 ± 0,06	0,47 ± 0,07	0,43 ± 0,05	0,53 ± 0,09	1,42 ± 0,06	1,36 ± 0,04	2,18 ± 0,06	2,22 ± 0,08
	Min-Max	0,30 - 0,80	0,10-0,90	0,20 - 0,60	0,10 - 1,00	1,20 - 1,70	1,20 – 1,60	1,80 - 2,40	1,90 - 2,60
	Median	0,50	0,50	0,50	0,35	1,30	1,30	2,00	2,05
Pilocarnin	(25. / 75.)	(0,35 / 0,75)	(0,38 / 0,63)	(0,35 / 0,60)	(0,28 / 0,45)	(1,20 / 1,45)	(1,25 / 1,45)	(1,90 / 2,20)	(1,80 / 2,23)
. nooaipin	M.W.±S.E.	0,56 ± 0,07	0,53 ± 0,07	0,44 ± 0,06	0,39 ± 0,06	1,34 ± 0,06	1,35 ± 0,06	2,04 ± 0,04	2,07 ± 0,08
	Min-Max	0,30 – 0,80	0,30 – 1,00	0,10 – 0,60	0,20 – 0,80	1,10 – 1,70	1,10 - 1,70	1,90 – 2,20	1,80 – 2,60
Pilocarpin 125	mg								
	Median	0,50	0,50	0,40	0,50	1,30	1,30	2,10	2,30
Vehikel	(25. / 75.)	(0,40 / 0,80)	(0,45 / 0,70)	(0,30 / 0,40)	(0,45 / 0,65)	(1,10 / 1,40)	(1,10 / 1,30)	(1,90 / 2,30)	(2,10 / 2,35)
Verinter	M.W.±S.E.	0,56 ± 0,08	0,57 ± 0,05	0,37 ± 0,04	0,58 ± 0,07	1,30 ± 0,08	1,23 ± 0,05	2,11 ± 0,07	2,20 ± 0,07
	Min-Max	0,30 - 0,80	0,40 - 0,80	0,20 - 0,50	0,40 - 1,10	1,10 – 1,70	1,00 – 1,50	1,90 – 2,40	1,70 -2,40
	Median	0,40	0,50	0,40	0,50	1,30	1,30	1,70	2,00
Pilocarpin	(25. / 75.)	(0,30 / 0,50)	(0,25 / 0,60)	(0,30 / 0,50)	(0,35 / 0,55)	(0,90 / 1,30)	(1,10 / 1,30)	(1,70 / 1,90)	(1,85 / 2,20)
	M.W.±S.E.	0,37 ± 0,04	0,42 ± 0,06	0,44 ± 0,05	0,44 ± 0,04	1,17 ± 0,09	1,30 ± 0,09	1,79 ± 0,06	2,01 ± 0,09
	Min-Max	0,20 - 0,50	0,10 - 0,60	0,30 - 0,70	0,20 - 0,60	0,90 - 1,50	1,10 – 2,00	1,60 - 2,10	1,50 - 2,50

Tab. 23: Tabellarische Übersicht zum Footprint nach akut systemischer Applikation von 75, 100 und 125 mg/kg Pilocarpin

			Activit	y Cage		Pilocarpi	n - Score		
		Anzahl Tı	ansitions	Anzahl F	Rearings				
		DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp		
Injektionstag 1									
	Median (25. / 75.)	749 (687 / 814)	807 (658 / 937)	33,5 (30,8 / 37,3)	36,5 (34,5 / 42,5)	0,00 (0,00 / 0,00)	0,00 (0,00 / 0,00)		
Vehikel	M.W.±S.E.	760 ± 39,7	791 ± 49,9	33,7 ± 1,41	38,5 ± 1,84	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	Min-Max	595 - 1006	539 - 1013	25,0 - 40,0	33,0 - 50,0	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00		
Injektionstag 7									
	Median (25. / 75.)	673 (571 / 916)	652 (428 / 817)	16,5 (5,75 / 25,3)	15,5 (2,75 / 26,5	4,00 (2,00 / 4,25)	2,50 (1,00 / 3,25)		
Pilocarpin	M.W.±S.E.	743 ± 66,1	676 ± 93,7	16,5 ± 3,27	15,0 ± 3,60	3,40 ± 0,43	2,40 ± 0,37		
	Min-Max	488 - 1149	262 - 1233	2,00 - 32,0	2,00 - 32,0	1,00 - 5,00	1,00 - 4,00		
Injektionstag 14									
	Median (25. / 75.)	533 (255 / 861)	674 (59,8 / 795)	18,5 (3,00 / 23,0)	18,0 (2,50 / 23,5)	3,00 (2,75 / 5,00)	2,50 (1,00 / 4,25)		
Pilocarpin	M.W.±S.E.	558 ± 119	539 ± 111	18,9 ± 6,07	15,7 ± 3,37	$4,00 \pm 0,80$	2,70 ± 0,56		
	Min-Max	37,0 - 1180	33,0 - 940	0,00 - 66,0	1,00 - 31,0	1,00 - 9,00	0,00 - 5,00		
Injektionstag 21									
	Median (25. / 75.)	542 (249 / 880)	316 (173 / 415)	11,5 (3,25 / 22,3)	4,00 (1,75 / 11,5)	286 (255 / 300)	300 (290 / 300)		
Pilocarpin	M.W.±S.E.	564 ± 103	343 ± 83,5	15,2 ± 4,86	8,40 ± 3,64	273 ± 11,0	292 ± 5,53		
	Min-Max	182 - 1043	50,0 - 992	1,00 - 51,0	0,00 - 39,0	196 - 300	258 - 300		

Tab. 24: Tabellarische Übersicht zum Activity Cage und Pilocarpin-Score nach chronisch systemischer Applikation von 100 mg/kgPilocarpin über einen Zeitraum von 21 Tagen

		Rota "Latency	arod to fall" (s)	Grip-strei Griffstä	ngth Test irke (g)	Wire-hang "Latency t	Test 180° to fall" (s)	
		DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp	DYT1	Wildtyp	
Injektionstag 1								
	Median (25. / 75.)	294 (203 / 300)	300 (297 / 300)	718 (610 / 832)	756 (713 / 865)	60,0 (60,0 / 60,0)	60,0 (60,0 / 60,0)	
Vehikel	M.W.±S.E.	255 ± 21,8	295 ± 3,97	727 ± 41,7	774 ± 28,8	$60,0 \pm 0,00$	$60,0 \pm 0,00$	
	Min-Max	104 - 300	261 - 300	564 - 934	633 - 922	60,0 - 60,0	60,0 - 60,0	
Injektionstag 7								
	Median (25. / 75.)	297 (253 / 300)	300 (249 / 300)	699 (583 / 813)	658 (573 / 735)	60,0 (60,0 / 60,0)	60,0 (60,0 / 60,0)	
Pilocarpin	M.W.±S.E.	268 ± 18,7	276 ± 13,8	689 ± 56,2	662 ± 41,3	60,0 ± 0,00	56,6 ± 2,31	
	Min-Max	145 - 300	191 - 300	312 - 916	470 - 919	60,0 - 60,0	40,0 - 60,0	
Injektionstag 14								
	Median (25. / 75.)	180 (147 / 298)	277 (251 / 300)	533 (408 / 612)	563 (499 / 730)	60,0 (60,0 / 60,0)	60,0 (60,0 / 60,0)	
Pilocarpin	M.W.±S.E.	204 ± 22,4	266 ± 14,0	504 ± 46,3	604 ± 44,7	54,0 ± 6,00	60,0 ± 0,00	
	Min-Max	119 - 300	154 - 300	190 - 716	427 - 837	0,00 - 60,0	60,0 - 60,0	
Injektionstag 21								
	Median (25. / 75.)	3,00 (2,75 / 4,00)	3,50 (2,75 / 4,50)	346 (300 / 461)	453 (378 / 526)	60,0 (60,0 / 60,0)	60,0 (60,0 / 60,0)	
Pilocarpin	M.W.±S.E.	3,20 ± 0,29	3,70 ± 0,45	387 ± 40,9	458 ± 29,9	59,8 ± 0,63	60,0 ± 0,00	
	Min-Max	2,00 - 5,00	2,00 - 6,00	277 - 704	328 - 629	58,0 - 60,0	60,0 - 60,0	

Tab. 25: Tabellarische Übersicht zur Rotarod-Performance, Grip-strength Test und Wire-hang Test 180° nach chronisch systemischer Applikation von 100 mg/kg Pilocarpin über einen Zeitraum von 21 Tagen

			Activit	y Cage		Pilocarpi	n - Score
		Anzahl Tr	ansitions	Anzahl I	Rearings		
		DYT1	Wildtyp	DYT1	DYT1 Wildtyp		Wildtyp
Pilocarpin 50 µg/l	Hemisphäre						
Median (25. / 75.)		1019 (650 / 1171)	702 (548 / 1017	21,0 (16,3 / 29,5)	18,0 (10,5 / 30,5)	0,00 (0,00 / 0,00)	0,00 (0,00 / 0,00)
venikei	M.W.±S.E.	961 ± 99,7	766 ± 110	22,6 ± 3,17	20,0 ± 4,55	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Min-Max	633 - 1388	539 - 1111	11,0 - 39,0	9,00 - 32,0	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00
Dilecornin	Median (25. / 75.)	106 (51,3 / 426)	465 (55,5 / 719)	0,00 (0,00 / 8,00)	1,00 (0,00 / 15,5)	5,50 (4,00 / 6,00)	4,00 (1,00 / 6,00)
Phocarpin	M.W.±S.E.	223 ± 85,2	403 ± 157	3,50 ± 1,91	6,4 ± 3,88	5,00 ± 0,73	3,60 ± 1,17
	Min-Max	20,0 - 685	45,0 - 876	0,00 - 14,0	Pilocarpin - Sco Wildtyp DYT1 W 18,0 0,00 0,00 (10,5 / 30,5) (0,00 / 0,00) (0,00 20,0 \pm 4,55 0,00 \pm 0,00 0,00 9,00 - 32,0 0,00 - 0,00 0,00 1,00 5,50 (0,00 / 6,00) (1,00 6,4 \pm 3,88 5,00 \pm 0,73 3,66 0,00 - 19,0 1,00 - 8,00 0,00	0,00 - 6,00	

Tab. 26:	Tabellarische	Übersicht zum	Activity Cage,	dem Pilocarpin-Sco	ore, der Rotard	od-Performance	sowie der neur	omuskulären l	Kraft im
	Grip-strength	Test und Wire	-hang Test nac	ch lokaler striataler	Applikation vo	on 50 µg/Hemisp	häre Pilocarpin		

		Rota "Latency	arod to fall" (s)	Grip-stre Griffstä	ngth Test àrke (g)	Wire-hang "Latency	Test 180° to fall" (s)
		DYT1	DYT1 Wildtyp		Wildtyp	DYT1	Wildtyp
Pilocarpin 50 µg/l	Hemisphäre						
	Median	271	295	585	578	60	60
Vahikal	(25. / 75.)	(192 / 300)	(223 / 298)	(531 / 654)	(444 / 756)	(0,00 / 0,00)	(0,00 / 0,00)
venikei	M.W.±S.E.	244 ± 24,6	267 ± 22,9	587 ± 32,7	595 ± 77,1	$60,0 \pm 0,00$	$60,0 \pm 0,00$
	Min-Max	112 - 300	179 - 300	435 - 741	383 - 839	60,0 - 60,0	60,0 - 60,0
	Median	156	239	524	537	60	60
Pilocarnin	(25. / 75.)	(113 / 222)	(190 / 285)	(447 / 598)	(488 / 569)	(0,00 / 0,00)	(0,00 / 0,00)
Filocalpin	M.W.±S.E.	165 ± 29,2	238 ± 25,0	528 ± 34,8	530 ± 20,0	$60,0 \pm 0,00$	$60,0 \pm 0,00$
	Min-Max	26,0 - 300	151 - 300	390 - 702	Grip-strength Test Griffstärke (g)Wire-hang Test "Latency to fall"DYT1WildtypDYT1 585 578 60 ($0,00 / 0,00$) $531 / 654$)($444 / 756$)($0,00 / 0,00$) $587 \pm 32,7$ $595 \pm 77,1$ $60,0 \pm 0,00$ $637 \pm 32,7$ $595 \pm 77,1$ $60,0 \pm 0,00$ $435 - 741$ $383 - 839$ $60,0 - 60,0$ 524 537 60 $447 / 598$)($488 / 569$)($0,00 / 0,00$) $628 \pm 34,8$ $530 \pm 20,0$ $60,0 \pm 0,00$ $60,0 - 702$ $461 - 569$ $60,0 - 60,0$	60,0 - 60,0	

Gemeinsame Legende für die Tabellen 27 und 28

In den beiden nachfolgenden Tabellen sind die im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen ermittelten mittleren Dichten [Neurone/mm³] striataler ChAT⁺-Interneurone für die verschiedenen Subregionen bei DYT1-Mäusen (Tab. 27) sowie Wildtyp-Tieren (Tab. 28) (jeweils durch die Käfig- bzw. Tiernummer gekennzeichnet) aufgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Interneuronen-Dichte der linken und rechten Gehirnhälfte gegliedert nach den sechs untersuchten striatalen Subregionen. Die Einteilung des Striatums erfolgte hierbei in Anlehnung an frühere Untersuchungen, die zeigten, dass zwischen diesen Gehirnregionen Unterschiede bezüglich der Morphologie und Neurochemie existieren (Gernert et al., 2000; Richter und Löscher, 1998). So wurde das Striatum anhand des stereotaktischen Atlas für das Mäusegehirn (Franklin und Paxinos, 2008) in eine anteriore (1,8 bis 1,1 mm relativ zu Bregma), eine mediale (1,1 bis 0,1 mm relativ zu Bregma) sowie eine posteriore Region (0,1 bis + 0,7 mm relativ zu Bregma) unterteilt. Der mediale Bereich des Striatums wurde zusätzlich in ein dorsomediales, dorsolaterales, ventromediales und ventrolaterales Striatum differenziert (s. Abb. 11). In den letzen drei Zeilen sind außerdem die für die rechte und linke Gehirnhälfte zusammengefassten Mittelwerte der jeweiligen Subregionen für DYT1- bzw. Wildtyp-Mäuse mit dazugehörigen Standardfehlern (S.E.) und Standardabweichungen (S.D.) aufgeführt. M.W., S.E. und S.D. bezogen auf das Gesamtstriatum sind in der kleinen Tabelle im unteren Bereich angegeben.

Käfig- / Tiernr.	ante	erior	dorso	medial	dorso	lateral	ventro	medial	ventro	lateral	post	erior
	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
DYT 1415	1236	1426	1032	1141	570	516	407	326	136	353	380	998
DYT 1460	856	856	558	532	634	862	608	532	380	482	523	428
DYT 1483	760	760	539	570	475	570	222	475	285	444	665	523
DYT 1495	951	951	733	923	353	272	489	462	27,2	217	475	523
DYT 1497	475	0	1039	507	558	76,1	482	127	279	76,1	444	63,4
Mittelwert	60)8	76	60	48	39	4	16	26	66	5	15
S.E.	70),5	49	9,8	40),5	35	5,9	31	,5	53	3,2
S.D.	44	46	58	39	47	79	42	25	37	72	46	63

Tab. 27: Dichte [Neurone/mm³] ChAT-reaktiver Interneurone in 6 untersuchten striatalen Subregionen bei transgenen DYT1-Mäusen

gesamt					
Mittelwert	494				
S.E.	19,1				
S.D.	498				

Käfig- / Tiernr.	anterior		dorsomedial		dorsolateral		ventromedial		ventrolateral		posterior	
	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
DYT 1401	951	1236	923	978	788	570	706	516	27,2	163	665	618
DYT 1410	665	380	877	702	58,5	175	234	351	0	0	143	95,1
DYT 1412	1046	1236	862	684	279	532	406	228	127	304	523	808
DYT 1414	665	665	923	1358	679	1141	543	733	489	435	238	380
DYT 1458	190	380	489	788	217	652	380	489	380	326	475	285
DYT 1467	475	1046	869	1222	706	489	407	598	109	516	570	475
Mittelwert	74	45	889		527		466		242		440	
S.E.	80),8	39,2		38,0		32,8		24,1		41,5	
S.D.	56	60	508		492		426		313		407	

Tab. 28: Dichte [Neurone/mm [*]] ChAT-reaktiver Interneurone in 6 untersuchten striatalen Subregionen bei Wildtyp-Mäi

gesamt					
Mittelwert	533				
S.E.	17,3				
S.D.	495				

PUBLIKATIONSLISTE

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab vorgestellt bzw. veröffentlicht:

Vortrag:

Kuschka, J., Hamann, M., Gioioso, V., Sharma, N., Richter, A. (2011): Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung des cholinergen Systems im DYT1-Mausmodell für die Torsionsdystonie. 21. VetPharm-Symposium, 29. und 30. September 2011, Leipzig.

Abstracts/Poster:

Kuschka, J., Lange, N., Hamann, M., Richter, A. (2010):

Nicht-invasive Genotypisierung transgener Mäuse.

In: Kuschka, J., Lemm, C. (Hrsg.): 5. Doktoranden-Symposium und DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences" am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin: Programm und Abstracts. 02. Juli 2010, Mensch und Buch Verlag. S. 63, ISBN: 978 3 86664 801 2.

Kuschka, J., Smiljanic, S., Hamann, M., Richter, A. (2011):

Examinations on the pathophysiological role of the cholinergic system in the dt^{sz} mutant hamster.

9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience society, March 23-27, 2011.

CD, Supplement to Neuroforum Februar 2011 (1), Volume XVII, ISSN 0947-0875.

Kuschka, J., Smiljanic, S., Hamann, M., Richter, A. (2011):

Examinations on the pathophysiological role of the cholinergic system in the dt^{sz} mutant hamster.

In: Hüske, C., Kaschny, M., Kohn, M., Vincze, S. (Hrsg.): 6. Doktoranden-Symposium und DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences" am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin: Programm und Abstracts. 01. Juli 2011, Mensch und Buch Verlag. S. 40, ISBN: 978 3 86664 980 4.

Kuschka, J., Smiljanic, S., Hamann, M., Creed-Carson, M., Nobrega, J. N., Richter, A. (2011):

Examinations on the pathophysiological role of the cholinergic system in the dt^{sz} mutant hamster.

5th International Dystonia Symposium, Barcelona/Spain, 20-22 October 2011, Proceedings.

Hamann, M., **Kuschka, J.**, Gioioso, V., Sharma, N., Richter, A. (2011): Pharmacological and immunohistochemical investigations of the cholinergic system in DYT1 mice.

5th International Dystonia Symposium, Barcelona/Spain, 20-22 October 2011, Proceedings.

Hamann, M., **Kuschka, J.**, Gioioso, V., Sharma, N., Richter, A. (2012): Investigations of the cholinergic neurotransmitter system in DYT1 mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 385 (Suppl 1): 33.

Veröffentlichung:

Hamann, M., Lange, N., **Kuschka, J.**, Richter, A. (2010): Non-invasive genotyping of transgenic mice: comparison of different commercial kits and required amounts. *ALTEX* 27 (3): 185-190.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt *Frau Prof. Dr. A. Richter* für die Überlassung des interessanten Themas und für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung und Korrektur dieser Dissertation.

Des Weiteren danke ich der *Dystonia Medical Research Foundation* (DMRF) für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei:

Frau Dr. Melanie Hamann für die fachliche Einweisung in die Verhaltensuntersuchungen sowie die Unterstützung bei deren Durchführung, für die Einweisung in die Operations- und Mikroinjektionstechnik sowie die statistischen und graphischen Computerprogramme und die wissenschaftliche Unterstützung. Darüber hinaus danke ich Ihr herzlich für ihre große Zuversicht, ihren unbeirrbaren Optimismus und ganz besonders für ihre Freundschaft;

Frau Dr. Svenja Sander sowie *Frau Dr. Nikola Lange* für ihre kompetente fachliche Unterstützung, die stets vorhandene Hilfsbereitschaft und die vielen nützlichen Tipps und Tricks;

Frau Carola Kapfer danke ich herzlich für die Einführung in verschiedene Labortechniken, ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfestellung insbesondere beim Westernblot, ihre stets geduldige Art und ganz besonders für die herzliche Atmosphäre im Labor;

Herrn Alfred Russ für die ausdauernde Hilfe bei der Durchführung der Verhaltensversuche und einigen histologischen Arbeiten sowie seine aufmunternden Geschichten und Lebensweisheiten;

Herrn N. Mnichatz für die Herstellung der Führungs- und Injektionskanülen;

den Tierpflegern, insbesondere Frau S. Schulz und Frau S. Wegener für die sorgsame Betreuung der Hamster und Mäuse;

meinen Mitstreitern *Nicole*, *Cathy*, *Christin* und insbesondere *Robert* für die wunderbare Zusammenarbeit, den regen und informativen Austausch und die Aufmunterungen auch in schweren Zeiten;

allen Mitarbeitern des Institutes herzlich für die freundliche Aufnahme und stets gewährte Hilfsbereitschaft;

Herrn F. Lotz, Institut für Biometrie, Freie Universität Berlin, für die kompetente Beratung bezüglich der statistischen Auswertung der Ergebnisse;

unserem Kooperationspartner *Prof. Dr. Jose N. Nobrega* (Neuroimaging Research Section, Centre for Addiction and Mental Health, Toronto, Kanada) und seinen Mitarbeitern für die Durchführung der rezeptorautoradiographischen Analysen;

Dr. Nutan Sharma (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Massachusetts, USA) und ihren Mitarbeitern für das Zurverfügungstellen von DYT1-Zuchtpaaren.

Ein großer und liebevoller Dank gilt *meinen Eltern* für die unentwegte, gleichermaßen moralische wie tatkräftige Unterstützung sowohl während meines Studiums als auch während meiner Dissertation.

Bardzo serdecznie dziękuje.

Meinem *Freund Tobias* danke ich für seine unermessliche Geduld, seine tatkräftige Unterstützung, die vielen motivierenden und aufbauenden Worte und seine Liebe.

Schließlich sei all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Potsdam, den 25.06.2012

Jagoda Kuschka