

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Sofern nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Chemikalien von SIGMA Chemie, Deutschland bezogen. Die Bestimmung des striatalen Tyrosinhydroxylase-Proteingehalts und der -Phosphorylierung sind in den Räumen des Laboratoire Motricité, Adaptation et Cognition (CNRS UMR 5227), Université Victor Ségalen, Bordeaux, Frankreich durchgeführt worden. Alle übrigen Untersuchungen, sämtliche stereotaktische Operationen und andere direkte Maßnahmen an den Versuchstieren sind in den Räumen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt worden. Ein positives Votum zur Durchführung der Experimente ist bei der zuständigen Behörde des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, Berlin unter der Tierversuchsnummer G0227/00 vom 04.09.2000 und eine Verlängerung unter der Tierversuchsnummer G0227/00 vom 18.09.2003 geführt.

2.2 Verwendete Tiere

Die für diese Arbeit verwendeten insgesamt 102 männlichen Wistar-Ratten stammten aus der Zucht Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland. Die Tiere wurden im temperatur- und luftfeuchtigkeitskontrollierten Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus in kleinen Gruppen gleichen Geschlechts gehalten. Futter und Wasser wurden nach Belieben gewährt. Alle Experimente wurden am Tage durchgeführt. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 280 – 420g schwer.

2.3 Pharmakologische Behandlung

Durch gezielte pharmakologische Manipulationen sollte in Anlehnung an unsere Vorarbeiten (Meissner et al., 2002; Meissner et al., 2001; Paul et al., 2000) die Regulation des striatalen Dopaminmetabolismus während STN-HFS durch intrastriatale Mikrodialyse weitergehend untersucht werden.

Abbildung 5 veranschaulicht die Wirkungsweisen der verabreichten Pharmaka. Pargylin bewirkt eine Hemmung der mitochondrialen in Neuronen und Gliazellen lokalisierten MAO-A und -B, welche Dopamin zu DOPAC abbaut (Roth et al., 1976; Waldmeier und Maitre, 1976; Planz et al., 1972) und führt zu einem reduzierten Dopaminmetabolismus. Die Konsequenz sollte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte basale extrazellulär-striatale Dopaminkonzentration sein. Nomifensin hemmt den präsynaptisch lokalisierten Dopamintransporter (DAT) und damit die

Dopaminwiederaufnahme sowie die transporterabhängige Dopaminfreisetzung (Arbuthnott et al., 1990; Zetterström et al., 1988; Butcher et al., 1988). Reserpin zerstört irreversibel die Speicher des präsynaptisch-vesikulären Pools und bewirkt damit eine zumindest stark verminderte kalziumabhängige, aktionspotenzialvermittelte exozytotische Dopaminfreisetzung (Guldberg und Broch, Jr., 1971; Dahlstroem et al., 1965).

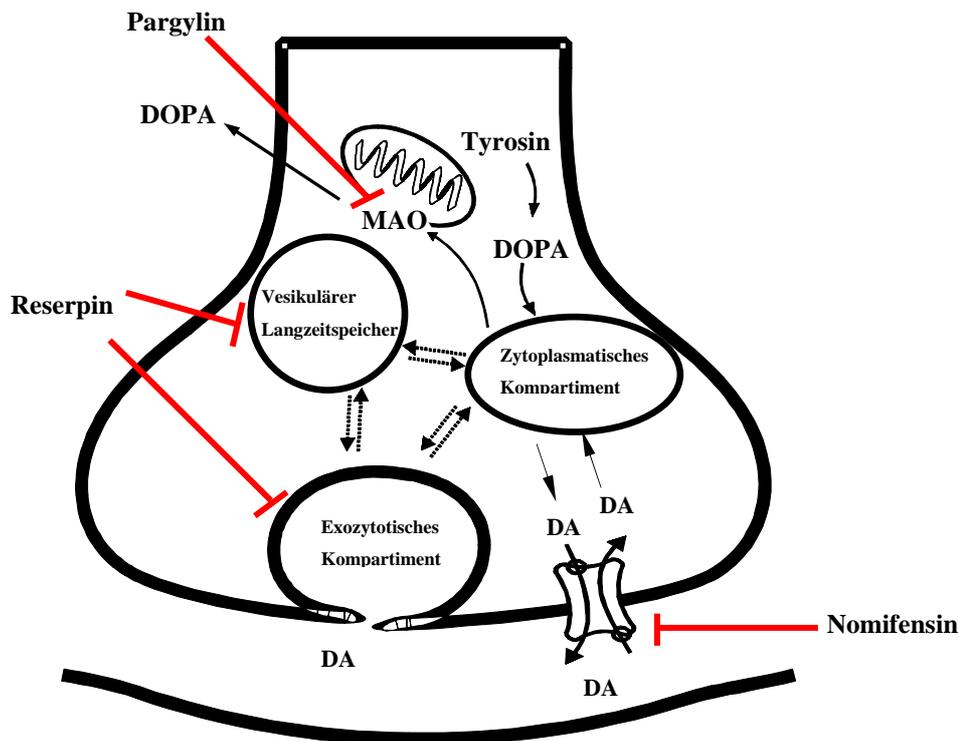


Abbildung 5: Illustrierung der Wirkung hier verwendeter Pharmaka. Pargylin hemmt die Monoaminoxidase (MAO) und führt so zu vermindertem Dopaminmetabolismus; Reserpin zerstört die vesikulären Speicher und führt zu einer Verminderung extrazellulären Dopamins; Nomifensin hemmt den Dopamin-Transporter und damit die Wiederaufnahme nach Exozytose sowie die transporterabhängige Freisetzung.

Die Tiere erhielten je nach Zugehörigkeit der experimentellen Gruppe entweder eine Vorbehandlung mit Pargylin (n= 15; Sigma, St. Louis, USA) in einer Dosierung von 75mg/kg KG intraperitoneal (i.p.) eine Stunde vor der stereotaktischen Operation (Implantation der STN-Elektrode und der striatalen Mikrodialysesonde) oder Reserpin (n= 16; Research Biochemicals Inc., Natick, USA) etwa 18 Stunden vor der Operation in einer Dosierung von 5mg/kg KG i.p. (Callaway et al., 1989). Aufgrund kurzer Halbwertszeit wurde Nomifensin (n=11; Research Biochemicals Inc., Natick, USA) einer dritten Versuchsgruppe in einer Konzentration von 1mM direkt der Dialyseflüssigkeit zur intrastriatalen Mikrodialyse hinzugegeben (Lindberg und Syvalahti, 1986). Alle applizierten Pharmaka wurden in steriler physiologischer Kochsalzlösung

gelöst.

Somit ergeben sich für die Gruppe der Tiere, die der intrastriatalen Mikrodialyse zur Quantifizierung des extrazellulären Dopamins und seiner Metabolite HVA und DOPAC zugeführt wurden, insgesamt sechs Versuchsgruppen. Jeweils zwei pro appliziertes Pharmakon, von denen wiederum die einen eine akute STN-HFS erhielten, den anderen die Elektrode ohne folgende Stimulation implantiert wurde.

Zusätzlich wurde eine Gruppe von 11 Tieren (5 STN-HFS; 6 Scheinstimulation) ohne jegliche pharmakologische Vorbehandlung nach selbigem Protokoll mittels Mikrodialyse untersucht.

2.4 Narkose, stereotaktische Operation und Mikrodialyse

Nach oben beschriebener jeweiliger pharmakologischer Vorbehandlung erhielten die Tiere zur Allgemeinnarkose Chloralhydrat (Merck, Deutschland; 400mg/kg KG i.p.) gelöst in steriler physiologischer Kochsalzlösung. Unter Überwachung der Narkosetiefe (Atemfrequenz und Kornealreflex) wurde wenn erforderlich während des Experiments mit 100mg/kg KG i.p. nachdosiert.

Das nachfolgend beschriebene Vorgehen der stereotaktischen Operation und Mikrodialyse erfolgte in Anlehnung an bestehende Vorarbeiten (Meissner et al., 2002; Meissner et al., 2001; Paul et al., 2000; Meissner et al., 2000):

Die Tiere wurden interaural in einem stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments, USA) fixiert. Die Körpertemperatur wurde durch eine Wärmematte, die mit einer rektalen Temperatursonde gekoppelt war, bei 37°C konstant gehalten (CMA150, CMA, Schweden). Nach Rasur der Kopfhaut wurde die Schädelkalotte mit einem Scherenschlag freigelegt und das Periost sorgfältig abpräpariert. Nach der Methode und dem stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson, 1997 wurden die Koordinaten für den linken STN (anterior -3,8mm; lateral 2,5mm; ventral -7,6mm) und das linke dorsolaterale Striatum (anterior 1,0mm; lateral 3,0mm; ventral -6,0mm) bestimmt. Anterior und lateral wurde ausgehend vom Bregma, ventral ausgehend von der Dura mater gemessen. Implantiert wurden in den STN eine konzentrisch-bipolare Elektrode (SNEX 100, Rhode Medical Instruments, Woodland Hills, USA) und in das Striatum eine Mikrodialysesonde (CMA12, CMA, Schweden).

An jedem Versuchstag erfolgte zunächst die Eichung der HPLC-Anlage durch eine quantitative Bestimmung definierter Standardkonzentrationen von Dopamin, DOPAC und HVA. Diese Standards wurden zur Quantifizierung der absoluten Konzentration von Dopamin und seiner

Metabolite im striatalen Dialysat verwendet.

Die Mikrodialysesonde wurde kontinuierlich mit künstlichem Liquor (125mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂*6H₂O, 2,5mM KCl, 5mM Na₂SO₄, 2,7mM NaHCO₃, 0,5mM NaH₂PO₄*2H₂O, 2,4mM NaH₂PO₄, pH7,4 eingestellt mit H₃PO₄) durchströmt. Eine kontinuierliche Flussrate der Dialyseflüssigkeit von 1µl/min wurde durch eine Mikroinjektionspumpe (CMA100, CMA, Schweden) gewährleistet, welche durch einen Polyethylenschlauch definierten Durchmessers mit dem Zufluss der Mikrodialysesonde verbunden war. Der Abfluss erfolgte ebenfalls durch einen Polyethylenschlauch in jeweils separate, mit 5µl 1M Perchlorsäure als Oxidationsschutz gefüllte, auf 4°C im Eisbad gekühlte Kunststoffröhrchen (Eppendorf, Deutschland). Nach etwa einer Stunde kontinuierlichen Flusses zur Stabilisierung des Systems, wurden Proben über je 20 Minuten (also 20µl) gesammelt. Diese wurden unverzüglich mittels Hochdruckchromatographie (Säule: Ultrasep ES 100 RP18, 4µm, 125*2mm; Sepserv, Berlin, Deutschland) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2ml/Minute getrennt, Dopamin und seine Metabolite DOPAC und HVA durch zwei in Reihe geschaltete Messzellen (1: Chromsystems, Instruments & Chemicals GmbH, Typ 41000, München, Deutschland; 2: BAS LC-4C, Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, USA) elektrochemisch detektiert und mit Hilfe eines Computerprogramms (Chrom-A-Dat 100, Barspec Systems Inc., Rehovot, Israel) aufgezeichnet. Eine Quantifizierung erfolgte durch Ermittlung der Fläche unter der Messkurve. Nach Erreichen von vier kontinuierlichen, stabilen Basiswerten (definiert als Mittelwert der vier Werte ± 10%) erfolgte während des Sammelns der fünften Probe die HFS des STN (Frequenz 130Hz, Pulsweite 60µs, Stromstärke 300µA) über 20min mit einem Stimulator (Coulbourn Instruments, Allentown, USA). Weitere acht Proben wurden nach der HFS gesammelt.

Am Ende des Versuchstages wurden die Tiere in tiefer Narkose durch Dekapitation getötet, das Gehirn aus dem knöchernen Schädel befreit und für etwa eine Woche postfixiert (4% Paraformaldehyd in 0,1M PBS).

2.5 Aktivitätsmessung der Tyrosinhydroxylase in vitro

Analog zu oben beschriebener Versuchsanordnung erfolgte die unilaterale Implantation einer Stimulationselektrode in den STN in tiefer Narkose. Anschließend wurde eine STN-HFS (130Hz, 60µs, 100µA) über 120 Minuten durchgeführt (n=10). Einer Kontrollgruppe wurde die STN-Elektrode ohne folgende elektrische Stimulation implantiert (n=7).

Direkt nach der Stimulation wurden die Tiere in tiefer Narkose durch Dekapitation getötet und

das Hirn unverzüglich aus dem knöchernen Schädel befreit. Nach der Methode von Segal und Kuczenski, 1974 erfolgte die makroskopische Präparation der Striata und der SNc bilateral. Der verbleibende Hirnanteil wurde zur Lokalisation der STN-Stimulationselektrode zunächst in Paraformaldehyd postfixiert (siehe 2.9).

Die Bestimmung der Enzymaktivität der TH erfolgte durch HPLC mittels elektrochemischer Detektion (Naoi et al., 1988; Nagatsu et al., 1979). Nach Präparation wurden die Gewebe unverzüglich in 50µl 0,25M Sucrose homogenisiert und anschließend mit einer Pufferlösung versetzt (10µl 1M Natrium-Acetat-Puffer (pH6,0), gelöst in 1M 2-Mercaptoethanol, 12µg Catalase, 10µl einer 10mM Eisen-Ammoniumsulfat-Lösung und 10µl 1mM NSD 101, einem Inhibitor des Enzyms, welches L-Dopa in Dopamin überführt (Aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase; EC 4.1.1.28)). Zunächst erfolgte eine Inkubation bei 37°C über 5 Minuten in einer 100%igen Sauerstoff-Atmosphäre. Die Reaktion wurde anschließend gestartet durch die Zugabe von Tyrosin und 6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (6R-BH4) (20µl 1,5mM L-Tyrosin, 10µl 10mM 6R-BH4) und nach 10 Minuten gestoppt durch die Zugabe von 600µl einer 0,5M Perchlorat-Lösung mit 300pmol L-Alpha-Methyldopa als internem Standard. 20µl wurden dann zur Messung der L-Dopa-Konzentration mittels HPLC verwendet (Meissner et al., 2001; Paul et al., 2000). Zur Quantifizierung des nicht enzymatischen Tyrosinumsatzes wurden analoge Messungen mit D-Tyrosin anstatt von L-Tyrosin durchgeführt. Die Quantifizierung des Gesamt-Protein-Gehaltes in den Striatum- und SNc-Gewebeproben erfolgte mit humanem Serumalbumin als Standard (Protein Assay, BioRad, Deutschland).

Die Aktivität der Tyrosinhydroxylase des jeweiligen Gewebes wurde durch folgende Berechnung ermittelt:

$$\text{L-Dopa [pmol/Minute/mg Protein]}_{\text{enzymatischer Umsatz}} = \text{L-Dopa}_{\text{Gesamtumsatz}} - \text{L-Dopa}_{\text{nicht enzymatischer Umsatz}}$$

2.6 Semi-quantitative Bestimmung der Tyrosinhydroxylase-mRNA mittels RT-PCR

Operation und Gewebepreparation wurden analog Abschnitt 2.5 durchgeführt. In die STN-HFS Gruppe wurden 10 Tiere, in die Gruppe der Scheinstimulation 9 Tiere eingeschlossen. Die gewonnenen Gewebe wurden unverzüglich auf Trockeneis aufgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

In Anlehnung an methodische Beschreibungen (Tokuyama et al., 1999; Bowyer et al., 1998) erfolgte die semiquantitative Bestimmung der Tyrosinhydroxylase-Expression.

Nach der Homogenisierung des Hirngewebes wurde die Isolierung der zellulären Gesamt-RNA mit dem Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Durch einen DNase-Verdau der gewonnenen RNA wurde eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen. Nach dem DNase-Verdau wurde die RNA mit Ethanol gefällt und in mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser resuspendiert. Eine erste Quantifizierung der gesamt-zellulären RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm. Hiernach wurden die einzelnen Proben mit DEPC-Wasser auf 1µg RNA pro 25µl Volumen eingestellt. Ein Umschreiben der mRNA in cDNA wurde mit der SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase mit Oligo-dT-Primern (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers erreicht. Diese cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Amplifikation der TH-cDNA wurden folgende PCR-Primer (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland) verwendet:

TH: vorwärts-Primer 5'390: 5'-CCC CAC CTG GAG TAT TTT GTG-3'; rückwärts-Primer 3'927: 5'-GGT GCA TTG AAA CAC GCG GAA-3'.

Als interner Standard wurde im gleichen Ansatz jeweils die cDNA für das HPRT-Gen (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase, HPRT, EC2.4.2.8) amplifiziert.

HPRT: vorwärts-Primer: 5'-CTTGACTATAATGAGCACTTCAG-3'; rückwärts-Primer: 5'-GGCTGCCTACAGGCTCATAGTGC-3'.

Die Primer für HPRT wurden so gewählt, dass sie in der genomischen Sequenz ein Intron flankieren, so dass gleichzeitig noch eine mögliche Verunreinigung durch genomische DNA ausgeschlossen werden konnte.

In einem Gesamtvolumen von 50µl wurde die PCR mit Taq DNA Polymerase (Eppendorf, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die ideale Annealingtemperatur beider Primerpaare in einem Versuchsansatz wurde zuvor mit einer Gradienten-PCR bestimmt und letztendlich auf 62°C festgelegt. Alle Reaktionen sind in einem MasterCycler (Eppendorf, Deutschland) durchgeführt worden. Nach je 20, 23 und 25 Zyklen wurden je 5µl Aliquot aus dem Reaktionsansatz entnommen. Die elektrophoretische Trennung der Aliquots erfolgte auf 1%igen Agarose-Gelen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf eine Membran (Hybond-N+, Amersham, UK) gebロットet (Sambrook und Russel, 2001).

Die Linearität der PCR wurde durch eine Regressionsanalyse der nach 20, 23 und 25 Zyklen entnommenen Aliquots überprüft.

2.7 Radioaktive Quantifizierung der PCR-Produkte

Zur Quantifizierung der erhaltenen und auf die Membran übertragenen PCR-Produkte (HPRT und TH) wurden diese nachfolgend mit spezifischen radioaktiv P^{32} -markierten DNA-Sonden hybridisiert (siehe Abbildung 6). Für die Sonden wurden separate TH- und HPRT-PCR-Produkte verwendet. Nach elektrophoretischer Trennung und Extraktion aus dem Agarose-Gel (PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen Ltd., UK) wurde die DNA photometrisch quantifiziert und etwa $25\mu\text{g}$ cDNA zur Sondenherstellung verwendet. Nach Angaben des Herstellers erfolgte die Sondenherstellung mit dem Rediprime II DNA Labelling-System und $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham, UK).

Die Membranen wurden zunächst für zwei Stunden in Hybridisierungspuffer (250mM Natrium-Phosphat, 1mM EDTA, 7% SDS, 1% BSA) bei 60°C prähybridisiert und nach Zugabe der vorbereiteten radioaktiven Sonde über Nacht bei gleicher Temperatur hybridisiert. In jeden Hybridisierungsvorgang wurden zur Fehlerminimierung und als weiteren Standard je eine separate Membran mit definierten TH- und HPRT-cDNA-Amplifikaten, die auf diese Membran gespottet wurden (25, 50 und 75pg je Spot), hinzugegeben. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen gewaschen (2x SSC-Puffer versetzt mit 0,5% SDS für 20 min. bei 60°C , dann 0,5x SSC-Puffer mit 0,5% SDS, ebenfalls bei 60°C).

Die Quantifizierung der mittels eines PhosphoImagers (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) erhaltenen Signale erfolgte mit der ImageQuant Software (Molecular Dynamics).

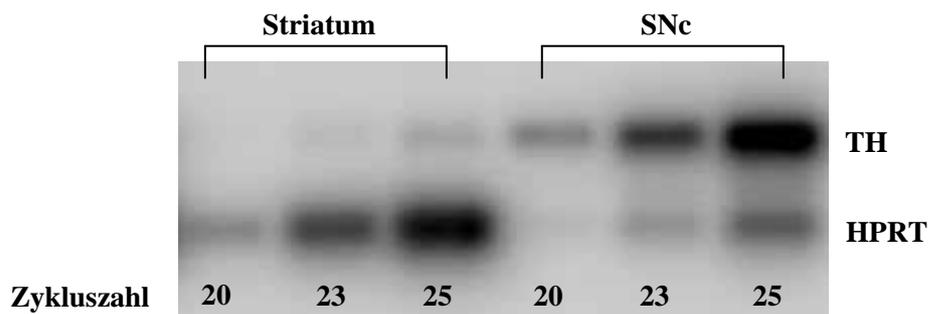


Abbildung 6: Repräsentative Darstellung einer gegen TH und HPRT ^{32}P -hybridisierten Membran nach PCR, Agarose-Gel-Elektrophorese und cDNA-Blot.

Die endgültige Auswertung erfolgte über die Relation des TH-Signals zum jeweiligen HPRT-Signal. Um einen Vergleich zwischen den einzelnen radioaktiv hybridisierten Membranen zu ermöglichen, wurde die Bande des jeweils mitgeführten 75pg Spots (TH und HPRT) analog ausgewertet und ging als einfacher Faktor in die Auswertung ein.

2.8 Quantitative Bestimmung der striatalen Tyrosinhydroxylase-Konzentration und –Phosphorylierung

Operation und Gewebepräparation sind analog Abschnitt 2.5 erfolgt. In die STN-HFS-Gruppe wurden 5 Tiere, in die Gruppe der Scheinstimulation 8 Tiere eingeschlossen.

Die makroskopisch präparierten und bei -80°C gelagerten Striatumdissekte wurden zunächst in je $300\mu\text{l}$ eines Lyse-Puffers gelöst (50mM Tris-HCl Puffer, 0.15M NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% Natriumdeoxycholat, $1\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, $2\mu\text{g/ml}$ Pepstatin A, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, pH 8.0; Suneja und Potashner, 1998). Hiernach erfolgte die photometrische Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (Protein Assay, Bio-Rad, Deutschland). Die Proben wurden mit Lämmli-Puffer (Bio-Rad, Deutschland) versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Vor der Gelelektrophorese sind die Proben jeweils für 5 Minuten bei 100°C denaturiert worden. $40\mu\text{g}$ Gesamtprotein pro Probe wurden dann über Polyacrylamidgele (Bio-Rad, Deutschland) elektrophoretisch getrennt. Nachfolgend wurden die getrennten Proteine auf Polyvinyliden-Fluorid-Membranen (Immobilon P, Millipore, Frankreich) in einer geeigneten Elektrophoresezelle (Mini-protean 2, Bio-Rad, Frankreich) überführt. Die Membranen sind dann für eine Stunde in 5% Magermilchpulver in TBS-Tween (Tris-HCl pH 7,5; 100mM NaCl; Tween 20 0,1%) geblockt und anschließend über Nacht gegen den jeweiligen Primärantikörper (anti-TH, anti-TH-phospho(Serin31), -phospho(Serin40) (Calbiochem, CA, USA; 1/500), anti-TH-phospho(Serin19) (Oncogene, CA, USA; 1/500)), oder gegen das Kontroll-Protein (anti- α -Aktin; Sigma Aldrich, MS, USA; 1/2500) jeweils gelöst in 0,1% TBS-Tween und 1% Magermilchpulver, hybridisiert worden. Die nachfolgende Inkubation mit dem anti-Hase Meerrettichperoxidase gekoppelten Zweitantikörper (Jackson Immunoresearch Laboratories, PA, USA; 1/5000) gelöst in 0,1% TBS-Tween und 0,1% Magermilchpulver erfolgte über zwei Stunden bei Raumtemperatur. Mittels Chemilumineszenz wurden die Antikörperkomplexe dann detektiert (Amersham, Schweden) und durch densitometrische Messung mittels GeneSnap und GeneTools quantifiziert (Chemigenius Gel Documentation System, UK).

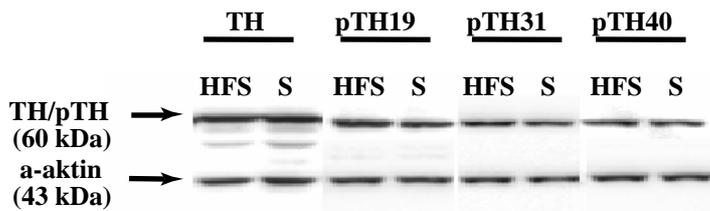


Abbildung 7: Repräsentatives Beispiel eines Western Blots hybridisiert gegen TH, pTH19, 31 und 40; α -Aktin diente als Kontroll-Protein. HFS: Hochfrequenzstimulation; S: Schein-Stimulation.

2.9 Histologische Verifizierung der Mikrodialysesonden- und Elektrodenlage

Für jedes Tier wurden Koronarschnitte des Hirns von 20 μ m Stärke in einem Kryostaten (LEICA, Deutschland) bei -18°C angefertigt und auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen. Die in 4% Paraformaldehyd postfixierten Hirne wurden zuvor in -40°C kaltem Methylbutan gefroren. Der Kresylviolett-färbung der Hirnschnitte (1% Kresylviolett in destilliertem Wasser, Merck, Deutschland) wurde eine De- und Rehydrierung in einer auf- und absteigenden Alkoholreihe vorgeschaltet. Nach erfolgter Färbung wurden die Objektträger erneut dehydriert, anschließend in Xylol gespült und dann luftgetrocknet. Nur Tiere mit exakter Elektroden-/ Sondenlokalisation in STN und dorsolateralem Striatum wurden in die Datenauswertung einbezogen.

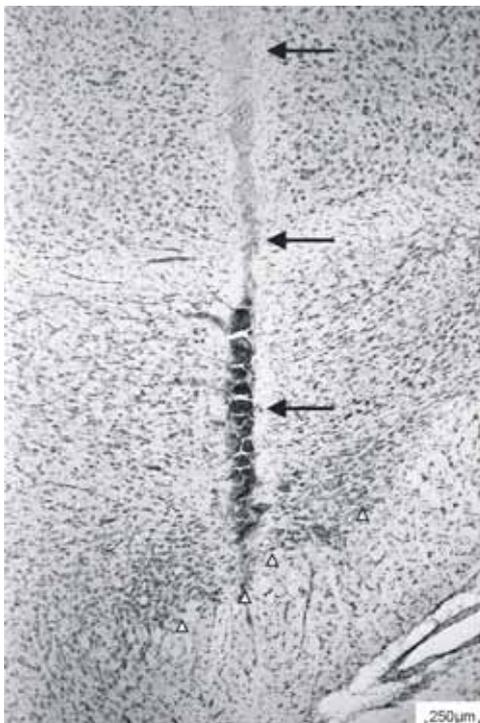


Abbildung 8: Exemplarische histologische Darstellung des Stichkanals der Stimulationselektrode (schwarze Pfeil) mit dem Endpunkt im STN (weiße Pfeile kennzeichnen die ventrale Grenze des Kerngebietes).

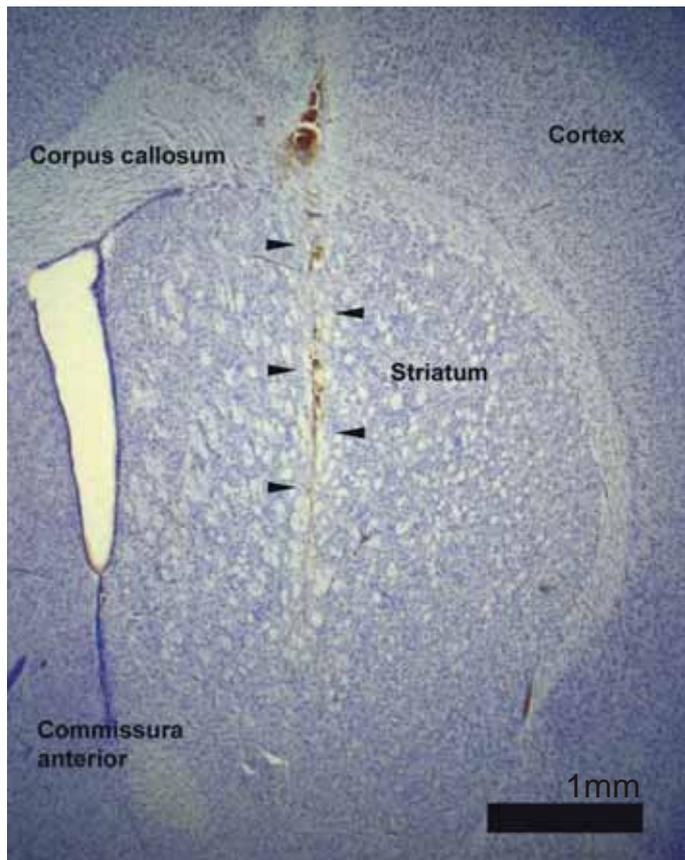


Abbildung 9: Exemplarische histologische Darstellung des Stichkanals der Mikrodialysesonde mit dem Endpunkt im Striatum.

2.10 Statistische Methoden zur Analyse der erhobenen Daten

Das Signifikanzniveau wurde bei 5% ($p \leq 0,05$) festgesetzt.

Alle statistischen Analysen wurden mit SigmaStat Version 2.03.0 (SPSS Inc., Illinois, USA), die zugehörigen Abbildungen mit SigmaPlot Version 7.0 (SPSS Inc.) erstellt.

2.10.1 Statistische Auswertung der Mikrodialyse-Daten.

Die Daten in den Abbildungen sind als prozentuale Abweichung vom Mittelwert der Basiswerte + Standardfehler dargestellt.

Mittels einer Varianzanalyse für wiederholte Messwerte (ANOVA RM) wurde zunächst überprüft, ob die STN-HFS die Konzentrationen von Dopamin und seiner Metabolite jeweils zum Basismittelwert des einzelnen untersuchten Tieres verändert. Bei signifikantem Unterschied wurden die Daten der verschiedenen Messzeitpunkte mit post-hoc t-Tests für verbundene Stichproben, korrigiert für multiples Testen nach der Methode von Student, Newman und Keuls, für die Tiere einer Gruppe (STN-HFS und Kontrollen separat) überprüft.

Mögliche Unterschiede zwischen STN-HFS und nicht stimulierten Kontrolltieren wurde

statistisch durch eine Varianzanalyse für unpaare Daten untersucht, gefolgt von post-hoc t-Tests für verbundene Stichproben, korrigiert für multiples Testen nach der Methode von Student, Newman und Keuls.

2.10.2 Statistische Auswertung der TH-Aktivität und der TH-mRNA.

Die Darstellung der Daten in den Abbildungen ist die prozentuale Abweichung vom Mittelwert der Basiswerte + Standardfehler.

Es erfolgte die Gegenüberstellung von linkem Striatum (stimulierte Seite) bzw. linker SNc der STN-HFS-Gruppe mit deren kontralateraler Seite. Zusätzlich wurden die Messwerte für Striatum und SNc der jeweils stimulierten Seite mit der linken (also ipsilateralen) Seite von nicht stimulierten Kontrolltieren verglichen.

Zur statistischen Sicherung wurde eine Varianzanalyse für unpaare Daten durchgeführt.

2.10.3 Statistische Auswertung der TH-Quantität und –Phosphorylierung

Die Darstellung der Daten in den Abbildungen ist die Abweichung von den Werten der nicht stimulierten Kontrolltiere bezogen auf 100% und dargestellt als Mittelwert der Basiswerte + Standardfehler.

Mittels eines t-Tests ist der Parameter TH-Quantität zwischen den Gruppen verglichen worden. Die Phosphorylierung der TH im linken dorsolateralen Striatum wurde mittels einer Zwei-Faktoren-Varianzanalyse (two-way ANOVA; Phosphorylierung und Stimulationsart als unabhängige Variablen) untersucht. Bei Signifikanz folgten post-hoc t-Tests für multiples Testen nach der Methode von Student, Newman und Keuls.