

Aus dem Institut für Anatomie  
der Universität Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Wree

**Rezeptordichten muskarinischer und nikotinischer Acetylcholinrezeptoren  
nach intrastriataler Botulinumneurotoxin-A-Injektion  
im 6-OHDA-Hemiparkinson-Modell der Ratte**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Felix Klawitter, geb. am 11.08.1990 in Wismar

Rostock, September 2017

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

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree, Institut für Anatomie der Universitätsmedizin  
Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Karl Zilles, JARA-Seniorprofessor am Institut für  
Neurowissenschaften und Medizin, Strukturelle und funktionelle Organisation  
des Gehirns (INM-1), Forschungszentrum Jülich

3. Gutachter: PD Dr. med. Christoph Kamm, Oberarzt an der Klinik und Poliklinik für  
Neurologie der Universitätsmedizin Rostock

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 25.09.2017

Datum der Verteidigung: 12.09.2018

## Abkürzungsverzeichnis

<b>4-DAMP</b>	1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium-iodide
<b>6-OHDA</b>	6-Hydroxydopamin
<b>aBTX</b>	$\alpha$ -Bungarotoxin
<b>ACh(R)</b>	Acetylcholin(-rezeptor)
<b>AF-DX 384</b>	<i>N</i> -(2-[(2 <i>R</i> )-2-[(dipropylamino)methyl]piperidin-1-yl]ethyl)-6-oxo-5 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i> ][1,4]benzodiazepine-11-carboxamide
<b>BG</b>	Basalganglien
<b>BoNT-A</b>	Botulinumneurotoxin-A
<b>BV</b>	Botulinum-Vehikel
<b>cAMP</b>	cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>CD</b>	Kalibrierte Dichte
<b>CIN</b>	Cholinerge Interneurone
<b>CPu</b>	Caudate-Putamen / Corpus Striatum / Striatum
<b>D<sub>1</sub></b>	Dopamin-Rezeptor 1
<b>D<sub>2</sub></b>	Dopamin-Rezeptor 2
<b>DA</b>	Dopamin
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<b>IP3</b>	Inositol-3-phosphat
<b>IPSP</b>	inhibitorisches postsynaptisches Potential
<b>KD</b>	Dissoziationskonstante
<b>L</b>	Realkonzentration
<b>M<sub>1</sub></b>	Subtyp 1 (muskarinische(r) Acetylcholinrezeptor(en))
<b>M<sub>2</sub></b>	Subtyp 2 (muskarinische(r) Acetylcholinrezeptor(en))
<b>M<sub>3</sub></b>	Subtyp 3 (muskarinische(r) Acetylcholinrezeptor(en))
<b>M<sub>4</sub></b>	Subtyp 4 (muskarinische(r) Acetylcholinrezeptor(en))
<b>M<sub>5</sub></b>	Subtyp 5 (muskarinische(r) Acetylcholinrezeptor(en))
<b>mAChR</b>	muskarinische(r) Acetylcholinrezeptor(en)
<b>MFB</b>	Mittleres Vorderhirnbündel
<b>mRNA</b>	mitochondriale Ribonukleinsäure
<b>MW</b>	Arithmetisches Mittel
<b>nAChR</b>	nikotinische(r) Acetylcholinrezeptor(en)
<b>NAC</b>	Nucleus accumbens
<b>NC</b>	Nucleus caudatus

<b>Ncl.</b>	Nucleus
<b>NMDA</b>	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PLD</b>	Phospholipase D
<b>QNB</b>	3-Quinuclidinylbenzylat
<b>RD</b>	Rezeptordichte(n)
<b>SA</b>	spezifische Aktivität
<b>SD</b>	Standardabweichung(en)
<b>SN</b>	Substantia nigra
<b>SNAP-25</b>	Synaptosom-assoziiertes Protein-25 kDa
<b>SNARE</b>	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
<b>SPN</b>	Striatale Projektionsneurone
<b>VTA</b>	Area tegmentalis ventralis
<b>ZNS</b>	Zentralnervensystem

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Parkinson-Syndrom	1
1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	2
1.2.1 Muskarinischer M <sub>1</sub> -AChR	2
1.2.2 Muskarinischer M <sub>2</sub> -AChR	4
1.2.3 Muskarinischer M <sub>3</sub> -AChR	5
1.3 Nikotinische AChR	6
1.4 Das 6-OHDA-Hemiparkinson-Modell der Ratte im Kontext von mAChR und nAChR	7
1.5 Botulinumneurotoxine	9
1.6 Rezeptorautoradiographie	10
1.7 Fragestellung	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Versuchstiere und Untersuchungsgruppen	14
2.2 Intrazerebrale Injektionen	14
2.3 Anfertigung der Hirnschnitte	16
2.4 Erstellung der Autoradiogramme	20
2.5 Messung der RD mit MCID™ Analysis	22
2.6 Auswertung mit LibreOffice Calc	27
2.7 Statistische Auswertung	28
2.8 Erstellung der Streudiagramme mit Origin®	28
3. Ergebnisse	29
3.1 nAChR - [ <sup>3</sup> H]Epibatidin	29
3.1.1 Ergebnisse der Gruppe L	30
3.1.2 Ergebnisse der Gruppen B, LB und LV	31
3.1.2 Relative Rezeptordichten	32
3.2 mAChR M <sub>1</sub> - [ <sup>3</sup> H]Pirenzepin	34
3.2.1 Ergebnisse der Gruppe L	34
3.2.2 Ergebnisse der Gruppen B, LB und LV	35
3.1.2 Relative Rezeptordichten	37
3.3 mAChR M <sub>2</sub> - [ <sup>3</sup> H]Oxotremorin	39
3.3.1 Ergebnisse der Gruppe L	39
3.3.2 Ergebnisse der Gruppen B, LB und LV	40
3.3.3 Relative Rezeptordichten	42

3.4 mAChR M <sub>2</sub> - [ <sup>3</sup> H]AF-DX 384	44
3.4.1 Ergebnisse der Gruppe L	44
3.4.2 Ergebnisse der Gruppen B, LB und LV	45
3.4.3 Relative Rezeptordichten	47
3.5 mAChR M <sub>3</sub> - [ <sup>3</sup> H]4-DAMP	49
3.5.1 Ergebnisse der Gruppe L	49
3.5.2 Ergebnisse der Gruppen B, LB und LV	50
3.5.3 Relative Rezeptordichten	52
4. Diskussion	54
4.1 Rezeptordichteverteilung im CPu	54
4.2 Rezeptordichteverteilung nach unilateraler 6-OHDA-Injektion	56
4.3 Rezeptordichteverteilung nach unilateraler BoNT-A-Injektion	61
4.4 Rezeptordichteverteilung nach unilateraler 6-OHDA- und anschließender BoNT-A-Injektion	66
4.5 Rezeptordichteverteilung der Gruppen L, LB und LV im Vergleich	70
4.6 Auswirkungen experimenteller Traumata auf die Rezeptordichteverteilung im Striatum der Ratte	71
5. Anhang	73
5.1 Literaturverzeichnis	73
5.2 Internetverzeichnis	80
5.3 Abbildungsverzeichnis	80
5.4 Tabellenverzeichnis	81
5.5 Veröffentlichungen	89
5.6 Erklärung der eigenständigen Anfertigung	90
5.7 Lebenslauf	91
6. Danksagung	92

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Parkinson-Syndrom

Die Parkinson-Erkrankung stellt eine neurodegenerative Bewegungsstörung dar, welche in Abhängigkeit von Genese und klinischer Symptomatologie heute in einzelne Subgruppen klassifiziert werden kann. Die Leitsymptome des Parkinson-Syndroms im engeren Sinne sind Tremor, Rigor, Brady- oder Akinese und die posturale Instabilität, wobei je nach vorliegendem Subtyp oder Kombinationssyndrom weitere neurologische oder psychische Störungen hinzu kommen (Gerlach et al., 2007, S. 2-3, 24). Die Basalganglien (BG), bestehend aus Ncl. caudatus (NC) und Putamen (zusammengefasst als Caudate-Putamen, kurz CPu; auch Corpus striatum, kurz Striatum), Globus pallidus Pars externa, Globus pallidus Pars interna sowie weiter gefasst auch der Substantia nigra (SN) und dem Ncl. subthalamicus, stellen hierbei die zentralen Strukturen des Telencephalons dar, deren Affektion im Rahmen der Parkinson-Erkrankung zu den o.g. klassischen motorischen Dysfunktionen führt (Zilles und Tillmann, 2010, S. 621; Obeso et al., 2008). Hierbei gilt die im Rahmen der Parkinson'schen Erkrankung auftretende Schädigung und schrittweise Zerstörung dopaminergener Neurone der SN mit konsekutiver Degeneration des nigrostriatalen Schaltkreises als einer der wesentlichen Pathomechanismen welcher in einer Dysregulation motorischer Regelkreise der BG resultiert (Gerlach et al., 2007; Obeso et al., 2008; Michel et al., 2016). Durch diese dopaminerge Deafferenzierung des Striatums erwächst ein striataler Dopaminmangel, was letztlich eine übermäßige Hemmung höhergeordneter motorischer Verarbeitungszentren in Thalamus und Kortex mit o.g. motorischen Symptomen bedingt. Der Verlust der nigrostriatalen Konnektion führt insgesamt zu einer Imbalance in der striatalen Neurotransmitterhomöostase, wobei das gestörte Verhältnis zwischen dopaminergem und cholinergem Transmittersystem für das Parkinson-Syndrom ist. Striatale cholinerge Interneurone (CIN) spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der motorischen Regelkreise der BG, indem sie die Signaltransmission striataler Projektionsneurone (SPN) modulieren, welche primär GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) als Neurotransmitter nutzen. Physiologischer Weise werden diese tonisch-aktiven Interneurone durch dopaminergen Input über Dopamin-D<sub>2</sub>-Rezeptoren (D<sub>2</sub>) gehemmt (Obeso et al., 2008). Bei der Parkinson'schen Erkrankung fällt diese Hemmung jedoch infolge der nigrostriatalen Deafferenzierung weg und die enthemmten Interneurone bedingen eine übermäßige Freisetzung von Acetylcholin (ACh) innerhalb des Striatums, was letztlich zu einer Aggravation der akinetischen Störungen

führt (DeBoer et al., 1993; Stehlmann et al., 1979; Rakovska et al., 2003; Gerlach et al., 2007, S. 82-83). Die Wiederherstellung des Transmittergleichgewichts durch den Einsatz von Anticholinergika stellt hierbei einen der ersten medikamentösen Ansätze in der Behandlung des Morbus Parkinson dar, welcher jedoch oft mit einer Vielzahl unerwünschten Nebenwirkungen verbunden ist (Gerlach et al., 2007, S. 81-82, 198).

## **1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren**

Die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) sind strukturell verwandt mit Rezeptoren der Rhodopsinfamilie und  $\beta$ 2-Adrenorezeptoren. Gemeinsam ist ihnen allen eine Lokalisation auf der Zelloberfläche, wo sie mit 7 transmembranalen Proteindomänen in die Plasmamembran integriert sind (Hulme et al., 2003; Haga et al., 2013). Bekannt sind bisher 5 Subtypen dieser Acetylcholinrezeptoren (AChR), welche aufgrund ihres Mechanismus der Signaltransduktion zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören und in zwei grundlegende Klassen eingeteilt werden können:  $M_1$ -ähnliche Rezeptoren ( $M_1$ ,  $M_3$ ,  $M_5$ ) stehen funktionell mit einem  $G_q/G_{11}$ -Komplex (Bezeichnung für verschiedene funktionelle Untereinheiten des G-Proteins) in Verbindung. Wirkung entfaltet dieses Protein über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche das in der Plasmamembran verankerte Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) in die Produkte Inositol-3-phosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet und ihrerseits verschiedene weitere intrazelluläre Signalkaskaden anstoßen.  $M_2$ -ähnliche Rezeptoren ( $M_2$ ,  $M_4$ ) wirken über inhibitorische G-Proteine  $G_i/G_o$  (Bezeichnung für verschiedene funktionelle Untereinheiten des G-Proteins), dessen Nettoeffekt eine Reduktion der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) ist und zur Verminderung der Aktivität der Proteinkinase A (PKA) im Zytoplasma führt (Jones et al., 2012; Haga, 2013). Im Folgenden wird nur auf die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Rezeptoren des Subtyps  $M_1$ ,  $M_2$  und  $M_3$  eingegangen.

### **1.2.1 Muskarinischer $M_1$ – AChR**

Um Aufschluss über die Verteilung des mAChR von Subtyp  $M_1$  im Zentralnervensystem (ZNS) der Ratten zu bekommen, wurden in den vergangenen Jahren verschiedene methodische Ansätze gewählt. Grundlegend sind hierfür zum einen Arbeiten, welche mittels in-situ Hybridisierung gezielte  $M_1$ -mRNA in einzelnen Hirnregionen nachgewiesen haben (Yan et al., 2001; Weiner et al., 1990; Harrison et al., 1996). Da dies jedoch nicht als Beweis

für die wirkliche Expression des Rezeptors gelten kann, wurden weiterführend Experimente zum Nachweis von tatsächlich exprimiertem Rezeptorprotein durchgeführt. Hierbei bedienen sich diverse Arbeitsgruppen immunhistochemischer Verfahren und Antikörperbindungsversuchen (Hersch et al., 1994; Hersch et al., 1995; Levey et al., 1991; Levey et al., 1994). Der  $M_1$  konnte somit im ZNS der Ratte in vielen unterschiedlichen kortikalen und subkortikalen Regionen, wie etwa Hippocampus, Striatum oder Amygdala nachweisbar (Levey et al., 1991; Levey et al., 1995; McDonald und Mascagni, 2010; Bernard et al., 1992; Hersch et al., 1994, Hersch et al., 1995). Explizite Betrachtungen für das Striatum der Ratte haben hierbei in quantitativer Hinsicht moderate bis hohe Expressionsstärken von mRNA und Rezeptorprotein im Vergleich zu anderen Hirnregionen ergeben (Bernard et al., 1992; Hersch et al., 1994; Yan et al., 2001). Auch konnten in Ligandenbindungsstudien mittels Rezeptorautoradiographie quantifizierbare Aussagen über die Rezeptordichte (RD) von  $M_1$  speziell im Striatum und anderen zentralnervösen Arealen getroffen werden (Muccioli et al., 1996; Araujo et al., 1990; Palomero-Gallagher et al., 2008, Cortes und Palacios, 1985; Bauer et al., 2005; Haghiri et al., 2009). Neben der Beschreibung der makroskopischen Verteilungsverhältnisse von  $M_1$ , gelang ebenfalls eine detaillierte Charakterisierung ultrastruktureller Expressionsmuster. Nachfolgend soll speziell das Striatum der Ratte Gegenstand genauerer Analysen sein. Diverse Arbeitsgruppen (Hersch et al., 1994; Hersch et al., 1995; Yan et al., 2001) zeigen im Hinblick auf die zelluläre Expression von  $M_1$  eine Lokalisation an Dendriten und Somata, kleiner bis mittelgroßer rundlicher Zellen welche als SPN identifiziert werden konnten. Funktionelle Studien weisen hierbei auf eine Lokalisation an der postsynaptischen Membran von Synapsen kortikostriataler und thalamostriataler glutamaterger Afferenzen mit SPN hin (Hsu et al., 1996; Lin et al., 2004; Perez-Burgos et al., 2008). Die Mehrzahl der  $M_1$  ist wie bereits ausgeführt auf den Dendriten und Somata der SPN exprimiert. Dies impliziert bereits die Vermutung, dass es sich hierbei nicht um einen Rezeptor handelt, dessen Hauptaufgabe in der Modulation der Neurotransmitterfreisetzung besteht. Tatsächlich zeigen drei Übersichtsarbeiten (Calabresi et al., 2000; Fryer et al., 2012, S. 226-228; Kreitzer, 2009), dass der funktionelle Schwerpunkt von  $M_1$  in der Beeinflussung postsynaptischer Ionenströme und Membranpotentiale der SPN liegt, was unabdingbar mit der Weiterleitung afferenter Signale verbunden ist. Im Hinblick auf exzitatorische Einflüsse aus dem Kortex und thalamischen Kerngebieten zeigen o.g. Arbeiten, dass die Aktivierung von  $M_1$  an der postsynaptischen Membran dieser glutamaterger Synapsen eine gewisse Sensibilisierung für glutamaterge Signaltransduktion hervorruft (Kreitzer, 2009). Elektrophysiologisches Korrelat ist dabei eine durch  $M_1$ -Aktivierung angestoßene

intrazelluläre Signalkaskade die zu einer positiven Regulation von ebenfalls subsynaptischen NMDA-(*N*-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren führt (Calabresi et al., 2000). Weiterhin gibt es Evidenz für eine Verminderung der Offenheitswahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen der subsynaptischen Membran, woraus eine Depolarisierung des Membranpotentials der SPN resultiert (Calabresi et al., 2000). Des Weiteren wird eine durch M<sub>1</sub> Aktivierung bedingte verlängerte Öffnungszeit für Natriumkanälen der subsynaptischen Membran und somit eine Verstärkung der glutamatergen Signaltransduktion postuliert.

### **1.2.2 Muskarinischer M<sub>2</sub> – AChR**

Diverse Untersuchungen zeigen eine breite Verteilung des mAChR vom Subtyp M<sub>2</sub> in vielen unterschiedlichen kortikalen und subkortikalen Arealen, wie dem Hippocampus, Striatum und Hirnstamm (Levey et al., 1991; Levey et al., 1995; Chaudhuri et al., 2005; Hersch et al., 1994, Hersch et al., 1995; Rouse und Levey, 1996; Weiner et al., 1990; Joyce, 1991a; Spencer et al., 1986). Im Hinblick auf die genaue zelluläre Lokalisation ist das Striatum besonders eingehend untersucht. Hersch et al., (1995) beschreibt eine Expression an ovalen Zellen mit langen Dendriten ohne Spinebesatz. Identifiziert werden diese Zellen von den Autoren als CIN. Hierbei wird eine präsynaptische Expression an den Axonterminalen der striatalen CIN angenommen, welche Synapsen mit den GABA-( $\gamma$ -Aminobuttersäure)-ergen SPN des Striatums bilden (Levey et al., 1991; Hersch et al., 1994, Hersch et al., 1995; Bernard et al., 1992; Weiner et al., 1990). Auch wird teilweise eine postsynaptische Expression vermutet (Levey et al., 1991; Hersch et al., 1994). Weiterhin verweisen Calabresi et al., (2000) auf eine mögliche Expression an Terminalen kortikostriataler Afferenzen. Funktionelle Betrachtungen decken sich dabei sehr gut mit der Lokalisation von M<sub>2</sub> als präsynaptischen Autorezeptor. So zeigen Calabresi et al., (2000) in einer Übersichtsarbeit, wie M<sub>2</sub> die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter (Glutamat, GABA, ACh) an Synapsen zwischen kortikostriatalen Afferenzen oder GABAergen Afferenzen mit striatalen SPN hemmend beeinflusst. Auch fasst die Monographie von Fryer et al., (2012) mehrere Arbeiten zu den funktionellen Aspekten des M<sub>2</sub> mAChR zusammen, deren Schlussfolgerungen mit den oben genannten übereinstimmen (Fryer et al., 2012, S. 225). So vermutet man bei Aktivierung von M<sub>2</sub> eine Verminderung der Offenheitswahrscheinlichkeit von Kalziumkanälen in der präsynaptischen Membran und damit eine Hemmung terminaler Exozytose von Neurotransmittern kortikostriataler und thalamostriataler Afferenzen. Daneben agieren diese Rezeptoren anscheinend auch an der postsynaptischen Membran striataler SPN durch Öffnung von Kaliumkanälen und

anschließender Generierung eines inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP), welches zur Hyperpolarisation der Zellmembran und damit die Weiterleitung eines Aktionspotentials unterbindet.

### **1.2.3 Muskarinischer M<sub>3</sub> – AChR**

Der mAChR vom Subtyp M<sub>3</sub> kann sowohl im Kortex als auch in subkortikalen Hirnregionen wie etwa dem Hippocampus, Striatum, Globus pallidus oder in pontinen sowie in thalamischen Kerngebieten von Nagetieren nachgewiesen werden (Levey et al., 1994, Poulin et al., 2010). Areale des Limbischen Systems und zum Teil auch des Striatums zeigen dabei in einigen Untersuchungen eine moderate bis hohe Expression des Rezeptors (Brann et al., 1988; Araujo et al., 1991; Levey et al., 1995). Andere Veröffentlichungen gehen jedoch von einem deutlich geringen Besatz des Striatums aus (Weiner et al., 1990; Levey et al., 1991; Levey et al., 1994). Hier konnte allerdings nicht mit jeder Untersuchungsmethode der Rezeptor zuverlässig detektiert werden und wenn, dann nur in geringem Maße. Dennoch liegen Untersuchungen vor, die vor allem für das Striatum der Ratte genauere Verteilungsmuster von M<sub>3</sub> aufzeigen (Hersch et al., 1994; Hersch et al., 1995; Yan et al., 2001). Diskutiert wird hierbei zum einen eine dendritische Expression auf einer Subpopulation der SPN. Zum anderen geht man von einer präsynaptischen Lokalisation des Rezeptors auf kortikalen und thalamischen Afferenzen aus, welche durch Synapsenbildung mit den Neuronen des Striatums einen Großteil des striatalen Inputs ausmachen (Hersch et al., 1994; Hersch et al., 1995; Yan et al., 2001).

Im Striatum scheint der Subtyp M<sub>3</sub> Einfluss auf die Signaltransduktion verschiedener Transmittersysteme zu haben. Beschrieben ist dazu eine Modulation der Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter wie ACh, Dopamin (DA) und Glutamat (DeBoer et al., 1990; Hsu et al., 1995). Angenommen wird hierbei, dass eine Aktivierung des präsynaptisch exprimierten Rezeptors die Transmitterfreisetzung aus dem terminalen Axonende hemmt (Niittykoski et al., 1999; Hsu et al., 1995). Auch Calabresi et al., (2000) verweisen auf eine präsynaptische Expression an kortikostriatalen Afferenzen mit Hemmung der Glutamatfreisetzung durch M<sub>3</sub> – Aktivierung. Außerhalb des Striatums liegt anhand eines Mausmodells Evidenz für die Beteiligung des M<sub>3</sub> Rezeptors an hippocampalen Lernprozessen vor (Poulin et al., 2010).

### 1.3 Nikotinische AChR

Die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) stellen eine heterogene Gruppe von ionotropen kanalgekoppelten Rezeptoren dar. Zusammengesetzt sind diese pentameren transmembranalen Poren aus diversen Untereinheiten, benannt  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ . Durch multiple Genexpression, vornehmlich der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, ergeben Vielzahl von möglichen Proteinkombinationen und damit auch unterschiedliche Rezeptorsubtypen, mit zum Teil differierenden Eigenschaften und Lokalisationen (Gotti et al., 2007; Gotti et al., 2009). So konnten mittels autoradiographischer Studien verschiedene Muster in der Bindungsverteilung von tritiummarkierten Liganden am nAChR wie [<sup>3</sup>H]Nikotin, [<sup>3</sup>H]Epibatidin und [<sup>3</sup>H] $\alpha$ -Bungarotoxin (aBTX) aufgedeckt werden. Hohe Bindungsaffinitäten von Nikotin wurden hierbei in thalamischen Kerngebieten, den Nuclei interpedunculares, Habenula, dem Colliculus superior, der Area tegmentalis ventralis (VTA), SN, dem Striatum und in den kortikalen Schichten 3 und 4 gefunden (Clarke et al., 1984; Clarke et al., 1985; Abood et al., 1981). Ähnliche Muster ergaben sich hierbei in Versuchen mit [<sup>3</sup>H]Epibatidin, welcher als sehr selektiv für hochaffine heteromere nAChR gilt (Tribollet et al., 2004; Perry und Kellar, 1995). Im Gegensatz dazu zeigen Versuche mit aBTX überwiegend andere Verteilungsmuster mit allenfalls geringer Überlappung mit den Nikotin- und Epibatidin-Bindungsstellen. Anreicherungen höherer Konzentrationen finden sich hierbei u.a. im Hippocampus, Hypothalamus, Colliculus superior, der kortikalen Schicht 1, diversen Hirnstammkernen sowie geringe bis keine signifikanten Bindungsaffinitäten im Striatum, Ncl. accumbens (NAC) und Kleinhirn (Clarke et al., 1985; Tribollet et al., 2004; Amenta et al., 1979; Davies et al., 1999). Gerade im Striatum scheinen hierbei die hochaffinen heteromeren Bindungsstellen markiert durch Nikotin oder Epibatidin zu dominieren (Davies et al., 1999; Forsayeth und Kobrin, 1997; Perry und Kellar, 1995; Costa und Murphy, 1983; Tribollet et al., 2004). Für die genaue subzelluläre Lokalisation im Striatum gibt es Hinweise auf eine präsynaptische Besetzung dopaminerger (Jones et al., 2001; Zoli et al., 2002; Clarke und Pert, 1985; Zhou et al., 2002), potentiell nigrostriataler (Jones et al., 2001; Clarke und Pert, 1985; Zhou et al., 2002) und kortikostriataler (Garcia-Munoz et al., 1996) Afferenzen sowie postsynaptisch auf intrastriatalen cholinergen (Sandor et al., 1991) und GABAergen (Rover et al., 2002; Koos und Tepper, 2002; McClure-Begle et al., 2009) Interneuronen. Ebenfalls konsistent mit der Vermutung, dass nAChR präsynaptisch auf nigrostriatalen Afferenzen lokalisiert sind, zeigen Nachweise von nAChR-mRNA in Neuronen der SN und ventralen Tegmentums (Le Novere et al., 1996; Sorenson et al., 1998; Charpantier et al., 1998; Elliot et

al., 1998; Ferrari et al., 1999). Speziell wurden präsynaptisch auf dopaminergen Terminalen im Striatum die Untereinheiten  $\alpha_4$ ,  $\alpha_7$  und  $\beta_2$  bzw. prä- und postsynaptisch  $\alpha_6$  als Bestandteile der hier exprimierten nAChR gefunden (Garcão et al., 2014; Grady et al., 2007; Wonnacott et al., 2000).

#### **1.4 Das 6-OHDA-Hemiparkinson-Modell der Ratte im Kontext von mAChR und nAChR**

Die Verwendung des Dopaminderivates 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) zur Induktion parkinson-ähnlicher Störungen in Tierversuchen geht auf Ungerstedt et al. zurück, welcher Versuche hierzu erstmals 1968 durchführte. Beschrieben ist die Anwendung an diversen Tierspezies wie Hunden, Katzen, Affen und Ratten (Blesa et al., 2012). Da 6-OHDA die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, muss es direkt intrazerebral verabreicht werden (Blesa et al., 2014). Die Injektionsorte beschränken sich hierbei zumeist auf das mittlere Vorderhirnbündel (MFB), die SN, die VTA, oder das Striatum (Blesa et al., 2012; Blesa et al., 2014; More et al., 2016; Blandini und Arentero, 2012). Nach der Applikation am Zielort wird 6-OHDA über Katecholamin-Transporter, wie den DA-Transporter, in die Zellen aufgenommen und führt über Radikalbildung und Hemmung der mitochondrialen Stoffwechselprozesse über eine verminderte Bildung energiereicher Substrate und direkte destruktive Effekte zum konsekutiven Zelltod (More et al., 2016).

Die Literatur liefert eine Vielzahl unterschiedlicher methodischer Ansätze zur Analyse von mAChR unter einer 6-OHDA-Applikation in das ZNS der Ratte. Ebenso zahlreich und zum Teil auch unterschiedlich sind dabei die Ergebnisse und gezogenen Schlussfolgerungen. Diverse Bindungsstudien wurden vielfach mit an mAChR unselektiven Liganden wie 3-Quinuclidinylbenzylat (QNB), Atropin, N-methyl-4-piperidyl benzilate (4-NMPB) oder Scopolamin durchgeführt (Kato, 1978; Suga, 1980; Reisine et al., 1979; Nomura et al., 1979; Gurwitz et al., 1979; Bellerocche et al., 1979). Dadurch ist es aber weder möglich die funktionell unterschiedlichen  $M_1$ -ähnlichen ( $M_1$ ,  $M_3$ ,  $M_5$ ) und  $M_2$ -ähnlichen ( $M_2$ ,  $M_4$ ) Rezeptorklassen zu unterscheiden, noch eine genaue subtypspezifische Untersuchung der einzelnen Rezeptoren durchzuführen. Als Injektionsorte sind bei den Untersuchungen der mAChR verschiedene Hirnregionen wie die SN (Kato, 1978; Bellerocche et al., 1982; Joyce, 1991a), das MFB (Suga, 1980; Reisine et al., 1979; Araki et al., 2000), eine intraventrikuläre Applikation (Bellerocche et al., 1979; Gurwitz et al., 1979) oder Injektionen außerhalb des ZNS (Nomura et al., 1979) beschrieben. Beobachtet sind signifikante Verminderungen (Kato, 1978; Bellerocche et al., 1982; Bellerocche et al., 1979; Gurwitz et al., 1979; Suga, 1980;

Nomura et al., 1979) oder keine Effekte (Reisine et al., 1979; Araki et al., 2000) auf striatale Rezeptorbindungen muskarinergere Liganden ipsilateral zur Läsion. Grundsätzlich werden hierbei zwei Erklärungsansätze dieser Ergebnisse diskutiert: Zum einen die Reduktion der Ligandenbindung infolge einer Verminderung der Absolutzahl von mAChR durch Neuronenuntergang, zum anderen werden von den o.g. Autoren funktionelle Mechanismen vermutet, wobei eine striatale cholinerge Hyperaktivität bei Verlust dopaminergere Afferenzen eine induzierte Rezeptorherunterregulation bedingen soll. Weiterführende Untersuchungen, welche sich gezielt mit den Auswirkungen einer 6-OHDA Läsionierung auf einzelne mAChR-Subtypen beschäftigen, zeigen uneinheitliche Ergebnisse. So können für M<sub>1</sub> vorübergehende (Klippel et al., 1993) sowie bleibende (Joyce, 1991a; Dawson et al., 1991) Reduktionen der Ligandenbindungen bzw. RD, aber auch keine Veränderungen (Knol et al., 2014; Wang et al., 2014) im Striatum beobachtet werden. Joyce et al. (1991a) zeigen beispielsweise eine Reduktion der RD von 1777 [fmol/mg Protein] auf 1422 [fmol/mg Protein]. Andere Angaben nach Dawson et al. (1991) zeigen eine Verminderung der RD von 157 [fmol/mg Gewebe] auf 118 [fmol/mg Gewebe]. Als Injektionsorte für 6-OHDA werden hierbei das MFB (Wang et al., 2014; Knol et al., 2014; Dawson et al., 1991), die VTA (Joyce, 1991b) und die SN (Klippel et al., 1993) beschrieben. Auch ist ebenfalls mehrfach eine extrastriatale Reduktion von M<sub>1</sub> nach Injektionen in das MFB publiziert. Diese konnten in kortikalen Regionen (Wang et al., 2014; Knol et al., 2014) und subkortikalen Kernformationen wie Amygdala und Hippocampus (Wang et al., 2014) beobachtet werden. Auch ist der Subtyp M<sub>2</sub> im Bezug auf Läsionierungsversuche mit 6-OHDA untersucht. Beschrieben sind hierfür Injektionen in die VTA (Joyce, 1991a, Joyce, 1991b; Belleruche et al., 1982) oder die SN (Klippel et al., 1993). Stets kann hierbei eine signifikante Verminderung der RD (Joyce, 1991a, Joyce 1991b; Belleruche et al., 1982) oder potentiell M<sub>2</sub> – vermittelten Effekten (Klippel et al., 1993) im gesamten Striatum oder Teilbereichen (CPu, NAC) verzeichnet werden. Nach Belleruche et al., (1982) reduzierte sich die RD auf 1660 [fmol/mg Gewebe] im Vergleich zur Kontrolle mit ca. 2000 [fmol/mg Gewebe]. Joyce, (1991a) zeigt diesbezüglich eine Reduktion der RD auf 1659 [fmol/mg Protein] im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit 2100 [fmol/mg Protein]. Autoradiographische Untersuchungen zeigen nach unilateraler 6-OHDA-Injektion in das MFB (Clarke und Pert, 1985; Zoli et al., 2002; Schmaljohann et al., 2006) signifikante Reduktionen der RD nAChR im ipsilateralen Striatum. Zoli et al., (2002) weisen bspw. eine Reduktion der RD um rund 50% (99 [fmol/mg Protein]) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (183 [fmol/mg Protein]) im Striatum nach. Ähnliche Tendenzen beschreiben auch Clark und Pert, (1985) mit einer Abnahme optischer Dichten um im Mittel 68%, leider ohne

die Angabe von Absolutwerten. Ebenso zeigt Schmaljohann et al., (2006) eine striatale Verminderung der Ligandenbindung um ca. 64%. Zusammenfassend werden diese Ergebnisse von den Autoren als Verlust von präsynaptischen nAChR auf nigrostriataler Terminalen im Striatum gedeutet. Stützend für diese Vermutung sind ebenfalls Daten, die eine Reduktion von nAChR-mRNA in der SN nach 6-OHDA-Läsionierung darlegen (Elliot et al., 1998; Visanji et al., 2006).

## **1.5 Botulinumneurotoxine**

Das Botulinumneurotoxin (BoNT) wird von verschiedenen Bakterienstämmen der Gattung *Clostridium* produziert, einem grampositiven anaeroben Mikroorganismus. Bisher bekannt sind acht Typen von Toxinen, welche in die Gruppen A,B,C,D,E,F mit einer Vielzahl von Subtypen eingeteilt werden (Peck et al., 2017). Ultrastrukturell bestehen BoNT aus einer schweren und einer leichten Proteinketten, welcher über nicht-kovalente Bindungen und eine Disulfid-Brücke zusammengehalten werden. Jedes der Toxine besteht aus drei funktionell aktiven Domänen: der Leichtketten-Domäne, welche die proteinspaltende Einheit darstellt, die HN-Domäne (N-terminales Ende der schweren Kette) welche zur Translokation der leichten Ketten in das Zytoplasma der Zielzelle beiträgt und die HC-Domäne (C-terminales Ende der schweren Kette), welche die Interaktion mit der präsynaptischen Membran vermittelt (Rossetto et al., 2014; Pirazzini et al., 2017). Diese Zielstruktur ist der sogenannte SNARE-Komplex (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), welcher die Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran gewährleistet und damit integraler Bestandteil einer synaptischen Zellverbindung ist. Der SNARE-Komplex bilden sich im Zuge der Interaktion zwischen intrazellulärem Vesikel und Plasmamembran aus dem Vesikelprotein Synaptobrevin und den Proteinen SNAP-25 (Synaptosom-assoziiertes Protein-25 kDa) und Syntaxin zusammen, welche an der präsynaptischen Membran lokalisiert sind. Dabei spalten die katalytischen Domänen der Proteasen BoNT-A (Botulinumneurotoxin-A) und -E das SNAP-25, BoNT-D, -F, -G das Synaptobrevin und BoNT-C das Syntaxin (Rossetto et al., 2014). Dieser Proteinkomplex ist deshalb so essentiell für eine transsynaptische Signaltransduktion, da er die Freisetzung von Neurotransmittern durch Fusion von Transmittervesikeln mit der präsynaptischen Membran vermittelt, um so die Freisetzung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt gewährleistet. Obwohl die unterschiedlichen BoNT-Typen an verschiedenen Untereinheiten des SNARE-Komplexes angreifen, resultiert als Nettoeffekt hierbei stets eine gestörte Interaktion zwischen Vesikel

und Plasmamembran und damit die Unfähigkeit zur Transmitterfreisetzung. Damit erfolgt die Unterbrechung der transsynaptischen Signaltransduktion. An cholinergen Neuronen hat dies die Hemmung der Freisetzung von ACh in den synaptischen Spalt zur Folge, wodurch die Konzentrationen von freiem ACh absinken. Die Wirkung von BoNT beschränkt sich hierbei nicht nur auf cholinergen Axonterminalen der motorischen Endplatte, sondern kann ebenfalls die Freisetzung anderer Neurotransmitter wie Noradrenalin, Glutamat, Serotonin oder DA hemmen (da Silva et al., 2015; Morris et al., 2002; Fortin et al., 2006; Najib et al., 1999).

## 1.6 Rezeptorautoradiographie

Die Autoradiographie beschreibt ein Verfahren, bei welchem die Verteilungsmuster radioaktiver Strahlung in biologischem oder nicht-biologischem Material sichtbar gemacht werden (Stewart, 1992, S. 3). Bei den dabei verwendeten radioaktiven Isotopen handelt es sich zumeist um  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Strahler, wie bspw. Tritium [ $^3\text{H}$ ], Kohlenstoff [ $^{14}\text{C}$ ] oder Iod [ $^{125}\text{I}$ ] (Stewart, 1992, S. 6, 27). Speziell wird bei der Rezeptorautoradiographie ein Molekül, welches in der Lage ist an einen Rezeptor zu binden, bspw. ein endogener Neurotransmitter oder synthetisch hergestellter Ligand, mit einem solchen radioaktiven Isotop gekoppelt. Hieraus entsteht eine Verbindung, die weiterhin die Fähigkeit besitzt an einen Rezeptor anzubinden und zusätzlich über den radioaktiven Zerfall des Isotops Strahlung emittiert (Stewart, 1992, S. 27). Grundsätzlich können zwei Verfahren unterschieden werden: a) *in-vivo* Rezeptorautoradiographie, also die autoradiographische Untersuchung am lebenden Organismus und b) *in-vitro* Rezeptorautoradiographie, die Gewebeuntersuchung nach Entnahme aus dem Organismus (Stewart, 1992; Strumpf und Solomon 1995, S. 7). Im Folgenden soll ausschließlich auf die, für diese Arbeit grundlegende, *in-vitro* Rezeptorautoradiographie eingegangen werden. Nach Anfertigung von Schnittserien des Gewebes, werden diese mit dem radioaktiven Liganden exponiert. Im wesentlichen werden hierbei nacheinander drei Prozesse der Gewebeaufarbeitung durchlaufen: 1. Vorinkubation, 2. Hauptinkubation, 3. Waschvorgang (Stewart, 1992, S. 29-30). Im Rahmen der Vorinkubation wird das Gewebe in einer Pufferlösung einer bestimmten Zusammensetzung für eine definierte Zeit gehalten. Dieser Schritt ist essentiell, um endogene Liganden von den Bindungsstellen der Rezeptoren zu entfernen, sodass eine Interaktion und Verdrängung des Radioliganden unterbunden wird (Stewart, 1992, S. 29). Der Vorinkubation schließt sich der Hauptvorgang, die eigentliche Inkubation an. Hierbei wird nun der radioaktiv markierte Ligand mit dem zu untersuchenden Gewebe in Kontakt gebracht. Der hieraus entstehende

Datensatz wird als „totale Bindung“ beschrieben, da sowohl die zu untersuchenden Rezeptoren als auch andere molekulare Strukturen mit dem Liganden markiert werden. Um die Erfassung von Messsignalen solchen unspezifischen Bindungen zu minimieren, wird nun dem Ansatz ein Kompetitor zugeführt, dessen Konzentration die des Radioliganden um ein Vielfaches übersteigt und ihn aus der Bindung mit dem Rezeptor verdrängt. Somit werden nur noch die „unspezifische Bindung“ erfasst. Die Datensätze „totale Bindung“ und „unspezifische Bindung“ werden im späteren Verlauf von einer Computersoftware subtrahiert und es resultiert ein Datensatz, welche die „spezifische Bindung“ des Radioliganden am favorisierten Rezeptor wiedergibt (Stewart, 1992, S. 30, 40). Zum Abschluss erfolgt dann im Waschvorgang die Entfernung von Pufferlösung und überschüssigem, nicht gebundenem Liganden (Stewart, S. 30). Zur Detektion der radioaktiven Emissionen wird anschließend ein strahlensensitiver Film mit den aufgearbeiteten Gewebeschnitten über Wochen bis Monate exponiert. Durch die Kumulation von Zerfallsereignissen entstehen auf dem Röntgenfilm eine Schwärzung (Stewart, 1992, S. 30-32). Um die Strahlenintensität mit dem Schwärzungsgrad des Röntgenfilms korrelieren zu können, ist die Anwendung von vordefinierten Standards nötig, welche einer bestimmten Schwärzung eine entsprechende Strahlenintensität, oder „Strahlenkonzentration“ des verwendeten Isotops und damit ein bestimmtes Maß an Ligandenbindung zuordnen (Stewart, 1992, S. 32). Durch optische Messung von markierten Gewebeschnitten und vordefinierten Standards mit einem speziellen Kamerasystem und Auswertung in einer entsprechenden Software (MCID, Quantimet 970, IBAS 2000, Magiscan MD), wird von Geweben und Standards nun das Ausmaß der Schwärzung des Röntgenfilms computergestützt in Graustufen überführt (Stewart, 1992, S. 32-33, 36-37). Je nach verwendetem System können so bis zu 256 Graustufen unterschieden werden, wobei die maximale „Strahlenkonzentration“ dem Wert 0 (Kontraststufe „Schwarz“) und die minimale dem Wert 255 (Kontraststufe „Weiß“) zugeordnet wird (Stewart, 1992, S. 37). Die so generierten Kontrastabstufungen des markierten Gewebes werden anschließend über die vordefinierten Standards kalibriert, d.h. den Grauwerten des digitalisierten Gewebeschnittes wird über die vordefinierten Grauwerte der Standards ein bestimmtes Maß an Strahlungsintensität und damit ein Maß an Ligandenbindung zugeordnet (Stewart, 1992, S. 32-38). Unter Kenntnis von spezifischer Aktivität (SA), Realkonzentration (L) und Dissoziationskonstante (KD) des Liganden, kann die absolute Konzentration von Ligand pro biologischer Einheit errechnet werden (Stewart, 1992, S. 32-33).

## 1.7 Fragestellung

Neurotransmitter und Transmitterrezeptoren sind essentieller Bestandteil der neuronalen Informationsverarbeitung. Für viele Erkrankungen des ZNS, wie den Demenzsyndromen, dem Morbus Huntington oder der Parkinson'schen Erkrankung ist bekannt, dass regelhaft eine gestörte Neurotransmitterhomöostase und Abweichungen im Verteilungsmuster der Transmitterrezeptoren vorliegen, was in einer Beeinträchtigung der neuronalen Signaltransmission resultiert. Mit besonderem Augenmerk auf dem Morbus Parkinson, konnten kürzlich veröffentlichte Publikationen (Wree et al., 2011; Holzmann et al., 2012; Antipova et al., 2013; Antipova et al., 2017) mit einem neuartigen experimentellen Ansatz am 6-OHDA-Hemiparkinson-Modell der Ratte zeigen, dass eine intrazerebrale BoNT-A-Injektion die induzierten motorischen Störungen dauerhaft mindert oder ganz aufhebt. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass BoNT-A ganz entscheidend in die bestehenden Veränderungen auf Transmitter- und Rezeptorebene eingreift und eine regulierende Wirkung zu haben scheint.

Die vorliegende Dissertation untersucht in einem bisher erstmalig durchgeführten Ansatz die Rezeptordichten striataler muskarinischer und nikotinischer Acetylcholinrezeptoren im Rahmen der o.g. Untersuchungen mit intrazerebral appliziertem BoNT-A am 6-OHDA-Hemiparkinson-Modell der Ratte. Dazu erfolgt unter Verwendung der graphischen Analysesoftware MCID™ Analysis die Auswertung des autoradiographisch erfassten CPU im Rattenhirn. Die entsprechenden Injektionsexperimente und die Erstellung der Autoradiogramme unter Nutzung der Radioliganden [<sup>3</sup>H]Epibatidin (nAChR), [<sup>3</sup>H]Pirenzepin (mAChR - M<sub>1</sub>), [<sup>3</sup>H]Oxotremorin (mAChR - M<sub>2</sub>, Agonist), [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 (mAChR - M<sub>2</sub>, Antagonist) und [<sup>3</sup>H]4-DAMP (mAChR - M<sub>3</sub>) erfolgten dabei im Vorfeld dieser Promotionsarbeit von den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Neurowissenschaften und Medizin am Forschungszentrum Jülich und am Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock. Konkret soll dabei untersucht werden, ob:

- die unilaterale Injektion von 6-OHDA in das rechte MFB der Ratte die autoradiographisch mit [<sup>3</sup>H]Epibatidin gemessene ipsilaterale RD striataler nAChR beeinflusst
- die unilaterale Injektion von 6-OHDA in das rechte MFB die autoradiographisch mit [<sup>3</sup>H]Pirenzepin, [<sup>3</sup>H]Oxotremorin, [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 und [<sup>3</sup>H]4-DAMP gemessenen RD striataler mAChR vom Subtyp M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> und M<sub>3</sub> verändert

- eine unilaterale Injektion von BoNT-A in das rechte Striatum die RD von nAChR und mAChR beeinflusst
- die aufeinander folgende Injektion von 6-OHDA in das rechte MFB und BoNT-A in das rechte Striatum die RD der striatalen nAChR und mAChR vom Subtyp M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> und M<sub>3</sub> moduliert.

Diskutiert werden abschließend im Kontext der bereits publizierten Literatur und auf Grundlage der eigens erhobenen Daten die Effekte von intrazerebral appliziertem 6-OHDA und BoNT-A auf die Verteilung der Rezeptoren und potentielle Wirkmechanismen.

## 2. Material und Methoden

Die tierexperimentellen stereotaktischen Injektionsversuche, die Entnahme der Hirne sowie die Herstellung der Hirnschnitte wurden von Prof. Dr. med. A. Wree und seinen Mitarbeitern am Institut für Anatomie der Universität Rostock durchgeführt.

### 2.1 Versuchstiere und Untersuchungsgruppen

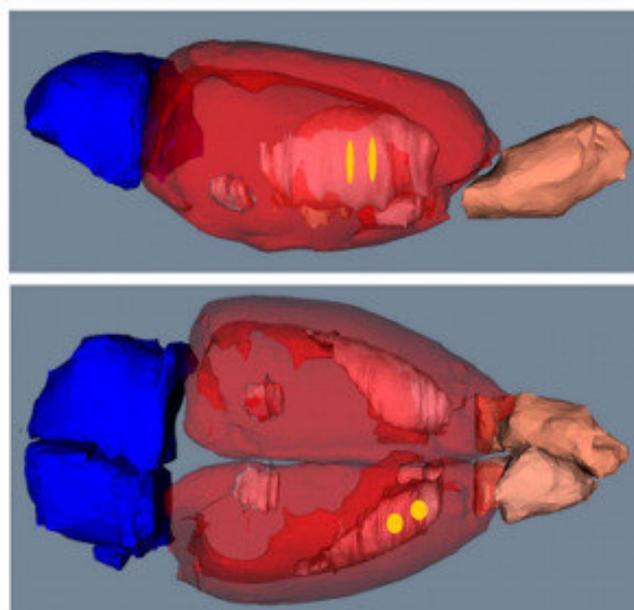
Für die Injektionsversuche wurden männliche, 3 Monate alte Wistar Ratten der Firma Charles River WIGA (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Alle Tiere wiesen zum Zeitpunkt der operativen intrazerebralen Injektion ein mittleres Gewicht von ca. 300g auf. Gehalten wurden die Ratten dabei unter standardisierten und kontrollierten Käfigbedingungen bei  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  Raumtemperatur, klimatisierter Umgebung, einem 12 h Tag / Nacht Zyklus und uneingeschränktem Zugang zu frischem Wasser und Standardfutter. Alle gesetzlichen Rahmenbedingungen im Sinne der Tierschutzbestimmungen wurden eingehalten (LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-003/13). Die Versuchstiere wurden in fünf Hauptgruppen aufgeteilt: **L** – Tiere mit 6-OHDA-Injektion; **LB** – Tiere mit 6-OHDA- und BoNT-A-Injektion; **LV** – Tiere mit 6-OHDA- und BoNT-Vehikel-Injektion; **B** – Tiere mit BoNT-A-Injektion; **K** – unbehandelte Kontrollen. Tabelle 1 gibt hierzu einen Überblick.

### 2.2 Intrazerebrale Injektionen

Die Tiere wurden mit einem Injektionsgemisch aus Ketamin (50 mg/ kg KG) und Xylazin (Rompun®; 4 mg/ kg KG) zunächst narkotisiert. Anschließend erfolgte die Injektion mit Hilfe einer stereotaktischen Vorrichtung stets unilateral rechts. Die Applikation von 4 µg 6-OHDA wurde gem. Bregma an den Koordinaten: anterior-posterior = -2.3 mm, lateral = -1.5 mm und ventral = -9.0 mm (Paxinos und Watson, 2007) entsprechend der Versuchsanordnung beschrieben in Wree et al., (2011) durchgeführt. Die Injektion von 2x1 µl BoNT-A-Lösung (BoNT-A + Phosphat-gepufferte Salzlösung) mit einer Gesamtdosis von 1 ng BoNT-A bzw. BoNT-Vehikel (BV) mit 2x1 µl TRIS-Pufferlösung, erfolgte diskontinuierlich an zwei separaten Punkten im CPu wie in Abb. 1 dargestellt: anterior = +1.3/-0.4 mm, lateral = -2.6/-3.6 mm und ventral = -5.5 mm (Paxinos und Watson, 2007; Wree et al., 2011).

**Tabelle 1: Zusammenfassung der Versuchsgruppen.** Überlebenszeit/Alter beschreibt die zeitliche Abfolge der Injektionen und den Zeitpunkt der Hirnentnahme; n = Anzahl Tiere. Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis

Gruppe	Untergruppe	Behandlung	Überlebenszeit/Alter	n
<b>K</b>	K	Kontrolle	300g Körpergewicht + 6 Wochen	<b>7</b>
<b>L</b>	L3W	6-OHDA	3 Wochen (nach 6-OHDA)	7
	L6W		6 Wochen (nach 6-OHDA)	7
	L6W1M		6 Wochen + 1 Monat (nach 6-OHDA)	7
	L6W3M		6 Wochen + 3 Monate (nach 6-OHDA)	7
	L6W6M		6 Wochen + 6 Monate (nach 6-OHDA)	7
	L6W9M		6 Wochen + 9 Monate (nach 6-OHDA)	6
<b>B</b>	B2W	BoNT-A	2 Wochen (nach BoNT-A)	7
	B1M		1 Monat (nach BoNT-A)	6
	B3M		3 Monate (nach BoNT-A)	7
	B6M		6 Monate (nach BoNT-A)	7
	B9M		9 Monate (nach BoNT-A)	7
<b>LB</b>	LB6W1M	6-OHDA+ BoNT-A	6 Wochen (nach 6-OHDA) + 1 Monat (nach BoNT-A)	9
	LB6W3M		6 Wochen (nach 6-OHDA) + 3 Monat (nach BoNT-A)	9
	LB6W6M		6 Wochen (nach 6-OHDA) + 6 Monat (nach BoNT-A)	9
	LB6W9M		6 Wochen (nach 6-OHDA) + 9 Monat (nach BoNT-A)	9
<b>LV</b>	LV6W1M	6-OHDA+ BV	6 Wochen (nach 6-OHDA) + 1 Monat (nach BV)	6
	LV6W3M		6 Wochen (nach 6-OHDA) + 3 Monat (nach BV)	6



**Abbildung 1: Koordinaten der stereotaktischen Injektion simuliert am Computermodell des Rattenhirns.**

Diskontinuierliche Injektion von 2x1µl BoNT-A an zwei Stellen im Striatum (gelb markiert) bei den Koordinaten: anterior= +1.3/-0.4 mm, lateral= -2.6/-3.6 mm und ventral= -5.5 mm. Abbildung modifiziert übernommen aus Hawlitschka, (2012)

### 2.3 Anfertigung der Hirnschnitte

Die Versuchstiere wurden jeweils nach genau definierten Beobachtungszeiträumen in den einzelnen Untersuchungsgruppen mit einer Überdosis von Ketamin und Xylazin getötet. Im Anschluss erfolgte keine weitere Fixierung. Die Rattenhirne wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und anschließend zur Herstellung der Schnittpräparate in den Kryostaten überführt. Nach Abtrennung des Bulbus wurden in 7 genau definierten Ebenen nach Paxinos und Watson (2007) jeweils 30 Schnitte mit  $50\ \mu\text{m}$  Dicke hergestellt und auf einem Gelatine beschichteten Objektträger fixiert: Schnittebene 1:  $+1.56\ \text{mm}$ , Schnittebene 2:  $-0.36\ \text{mm}$ , Schnittebene 3:  $-0.84\ \text{mm}$ , Schnittebene 4:  $-2.16\ \text{mm}$ , Schnittebene 5:  $-2.52\ \text{mm}$ , Schnittebene 6:  $-3.60\ \text{mm}$ , Schnittebene 7:  $-5.20\ \text{mm}$ , gemäß Bregma. Abbildungen 2 bis 8 zeigen die einzelnen Schnittebenen mit Annäherung an die genannten Koordinaten gem. Paxinos und Watson, (2006) (Abbildungen modifiziert übernommen nach Eingabe der o.g. Koordinaten aus: Gaidica, Matt: Rat Brain Atlas. <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/>).

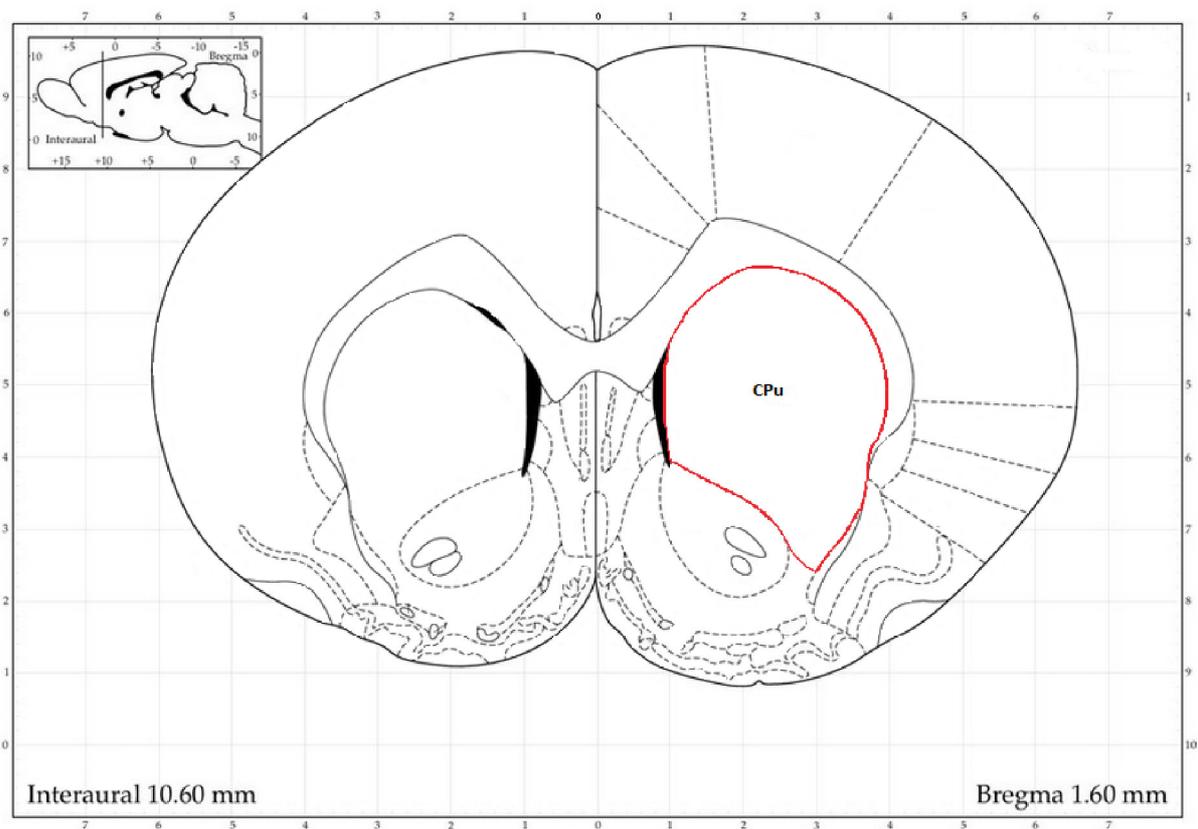


Abbildung 2: Schnittebene 1. Messbereich rot markiert

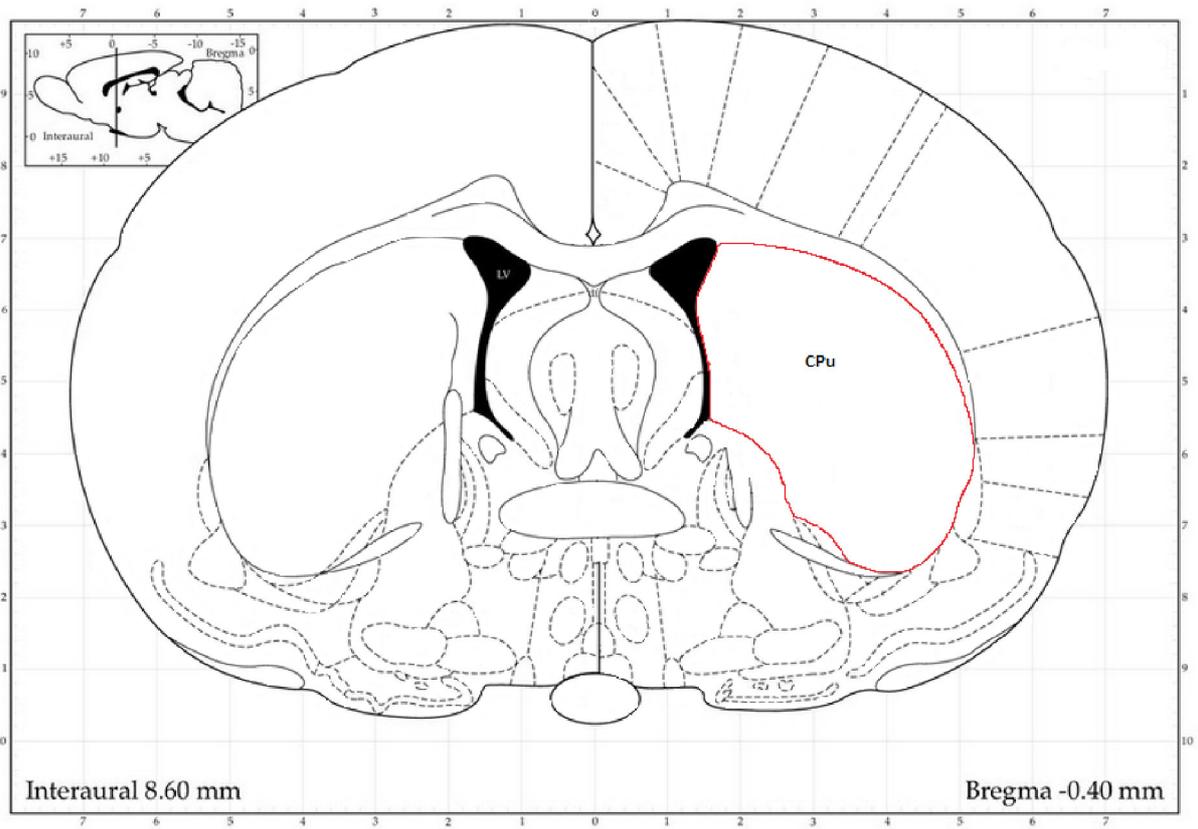


Abbildung 3: Schnittbene 2. Messbereich rot markiert

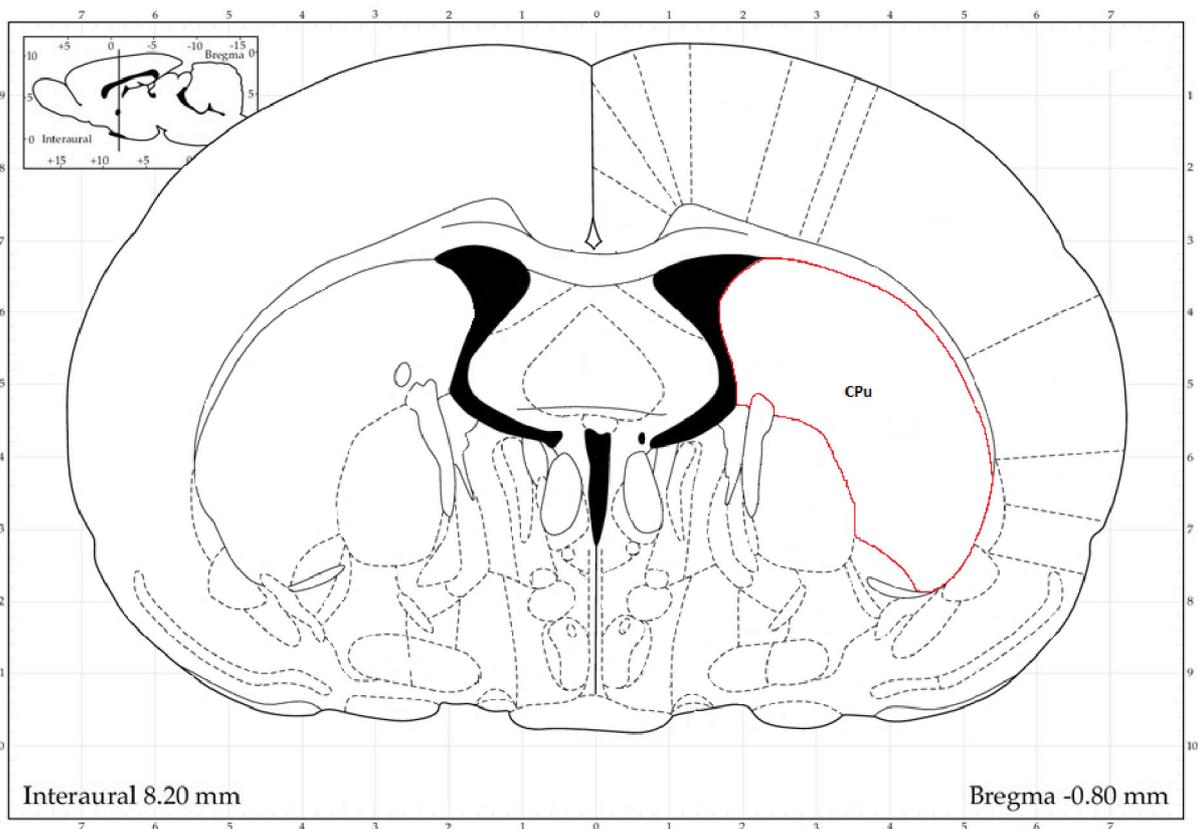
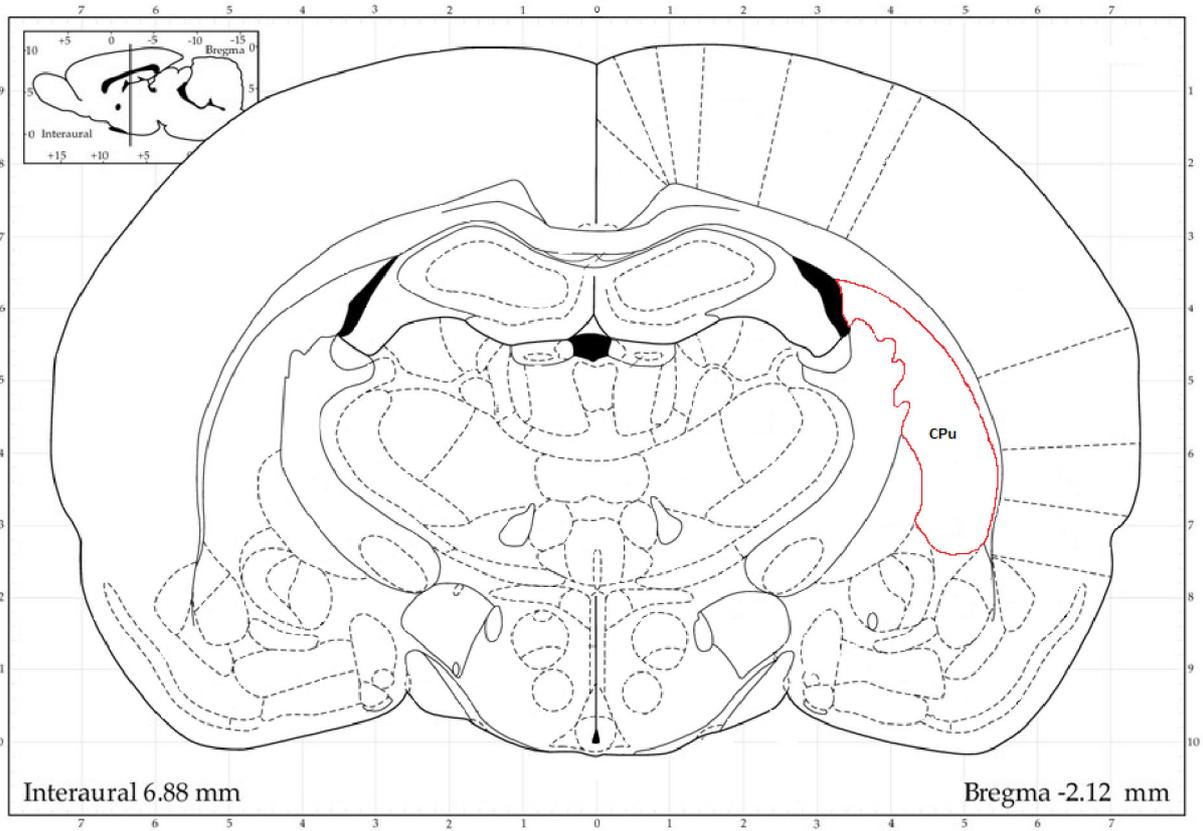
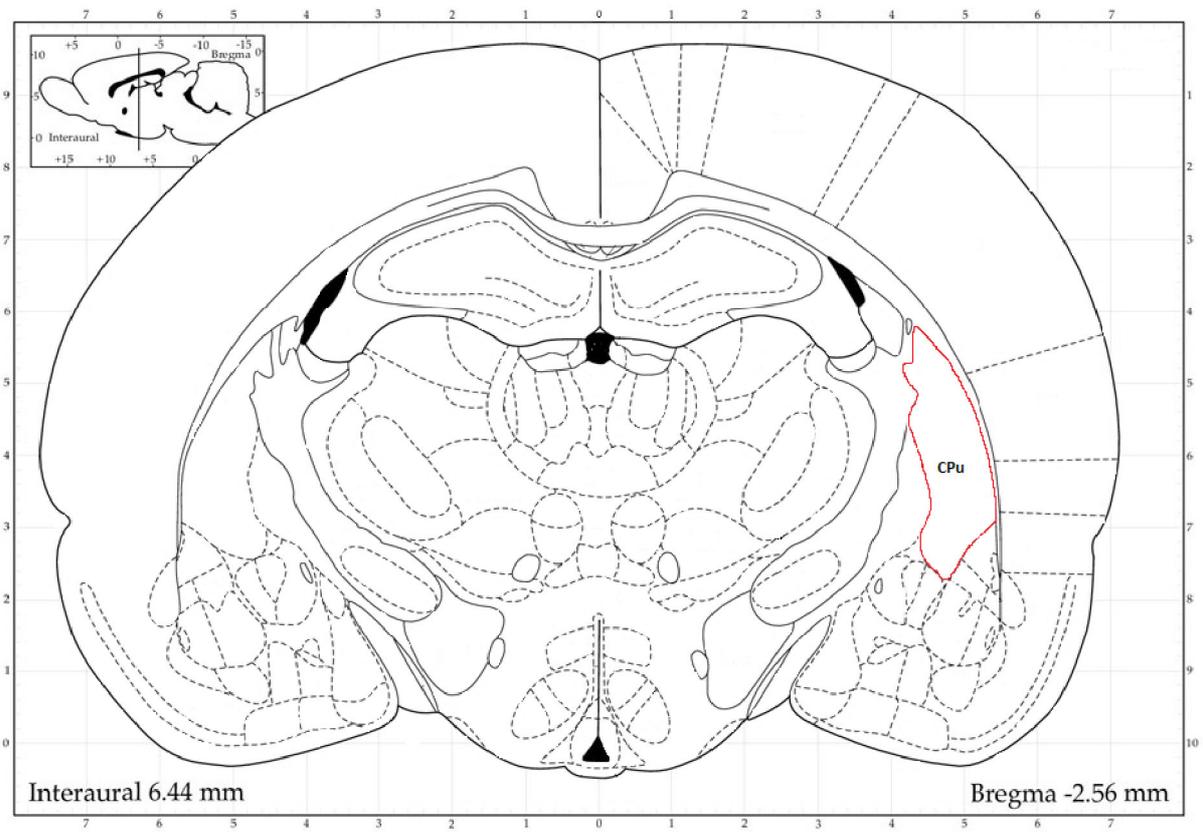


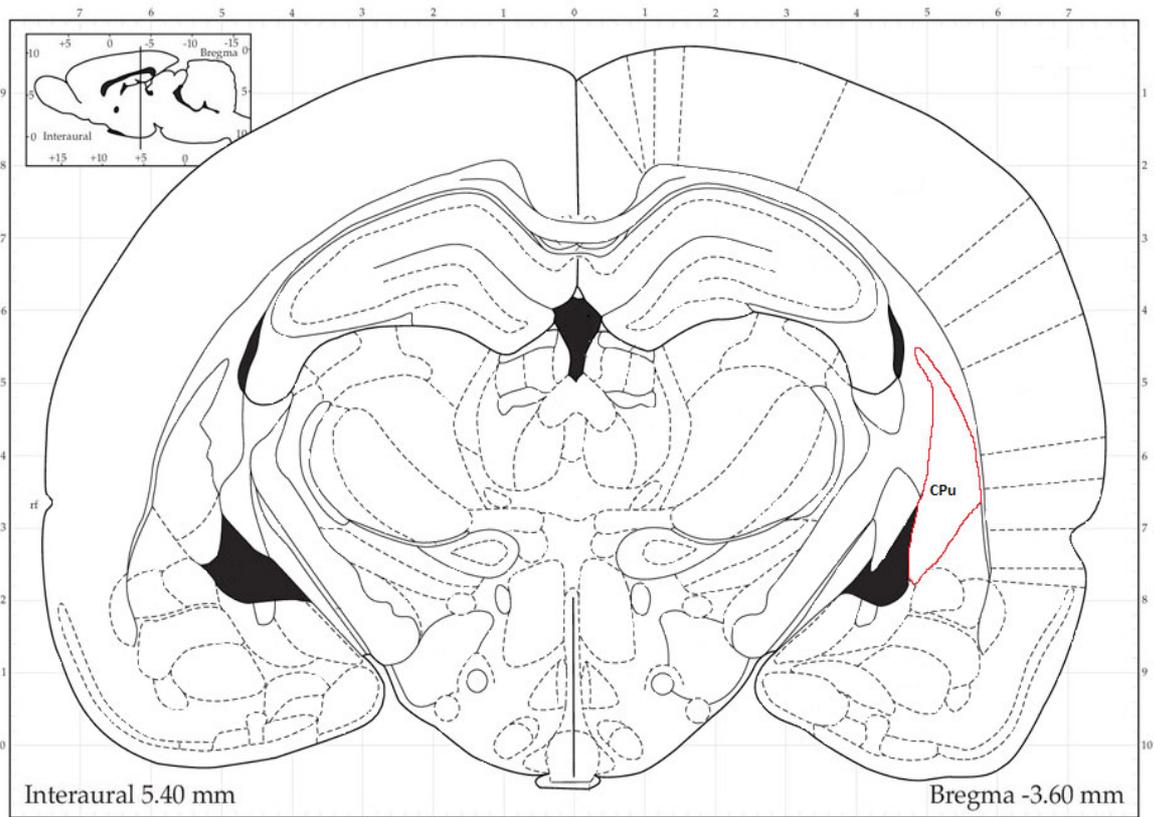
Abbildung 4: Schnittbene 3. Messbereich rot markiert



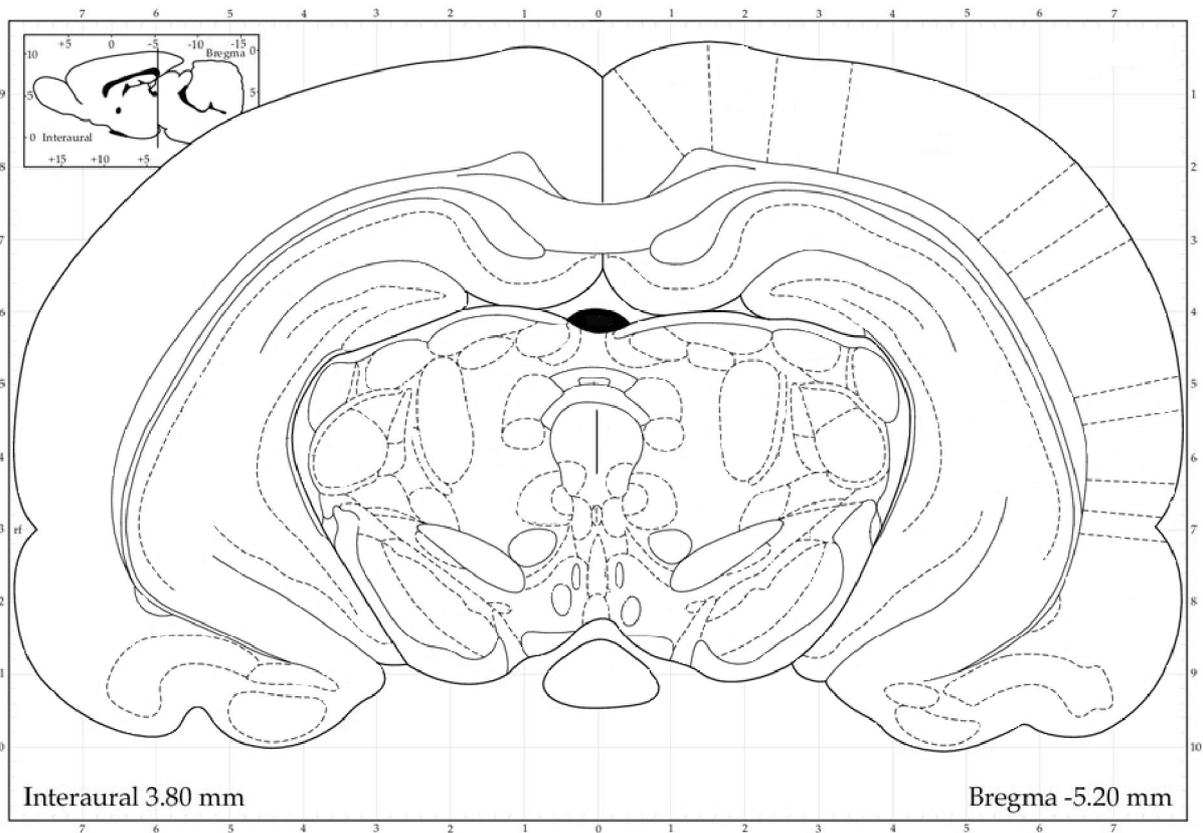
**Abbildung 5: Schnittbene 4. Messbereich rot markiert**



**Abbildung 6: Schnittbene 5. Messbereich rot markiert**



**Abbildung 7: Schnittebene 6. Messbereich rot markiert**



**Abbildung 8: Schnittebene 7. Messbereich nicht dargestellt**

## 2.4 Erstellung der Autoradiogramme

Die autoradiographischen Untersuchungen wurden im Hirnforschungszentrum Jülich am Institut für Neurowissenschaften und Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Karl Zilles von Markus Cremer und seinen Mitarbeitern ausgeführt. Für die Untersuchung der nAChR und mAChR wurden die Liganden [<sup>3</sup>H]Epibatidin (nAChR, Agonist), [<sup>3</sup>H]Pirenzepin (mAChR M<sub>1</sub>, Antagonist), [<sup>3</sup>H]Oxotremorin (mAChR M<sub>2</sub>, Agonist), [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 (mAChR M<sub>2</sub>, Antagonist) und [<sup>3</sup>H]4-DAMP (mAChR M<sub>3</sub>, Antagonist) genutzt und von der Firma Perkin Elmer (Rodgau, Deutschland) bezogen. Tabelle 2 zeigt die ligandenspezifischen Eigenschaften der Versuchsansätze. Die Durchführung erfolgte dabei mit den gemäß Tabelle 3 aufgeführten Reagenzien und Versuchsschritten: Zunächst wurden die Hirnschnitte der Präinkubation unterzogen, um endogene Liganden aus zu waschen und die Schnitte zu rehydrieren. Anschließend wurde bei der Hauptinkubation dem Ansatz der radioaktiv markierte Ligand zur Bestimmung der totalen Bindung zugesetzt. Durch Hinzugabe eines jeweils nicht-radioaktiv markierten Kompetitors wurde die unspezifische Bindung bestimmt. Die sich anschließende Waschphase diente der Beseitigung überschüssiger Liganden und Pufferlösung. Ein  $\beta$ -sensitiver Röntgenfilm der Firma Kodak PerkinElmer LAS GmbH (Deutschland) wurde nachfolgend mit den behandelten Hirnschnitten und vorbestimmten radioaktiven Standards für mehrere Wochen exponiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte mit einem Hyperprozessor der Firma Amersham Biosciences (Amersham, GB; jetzt: GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland). Abschließend wurden die Schnittbilder mit Hilfe einer CCD-Kamera der Firma Carl Zeiss Microscopy GmbH (Göttingen, Deutschland) digitalisiert.

**Tabelle 2: Übersicht der ligandenspezifischen Eigenschaften**

<b>[<sup>3</sup>H]Ligand</b>	<b>Spezifische Aktivität SA [Ci/mmol]</b>	<b>Dissoziationskonstante KD [nM]</b>	<b>Realkonzentration L [nM]</b>
<b>[<sup>3</sup>H]Epibatidin</b>	55,80	0,11	0,11
<b>[<sup>3</sup>H]Pirenzepin</b>	82,30	21,60	10,33
<b>[<sup>3</sup>H]Oxotremorin</b>	78,60	1,70	1,65
<b>[<sup>3</sup>H]AF-DX 384</b>	106,50	5,20	5,07
<b>[<sup>3</sup>H]4-DAMP</b>	80,30	1,00	0,98

**Tabelle 3: Zusammenfassung der Inkubationsprotokolle der Autoradiographie.** RT: Raumtemperatur. Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis

<b>[<sup>3</sup>H]-Ligand</b>	<b>Rezeptor</b>	<b>Kompetitor</b>	<b>Inkubationslösung</b>	<b>Präinkubation</b>	<b>Inkubation</b>	<b>Washvorgang</b>
<b>Epibatidin (0,5 nM)</b>	nAChR	Nicotin Di-D-Tartrat (100 µM)	15 mM HEPES (pH: 7,5) + 120 mM NaCl + 5,4 mM KCl + 0,8 mM MgCl <sub>2</sub> + 1,8 mM CaCl <sub>2</sub>	20 min bei RT	90 min bei RT	5 min bei 4°C
<b>Pirenzepin (10 nM)</b>	mAChR – M <sub>1</sub>	Pirenzepin dihydrochlorid (2 µM)	Modif. Krebs-Puffer (pH=7,4)	15 min bei 4°C	60 min bei 4°C	2x1 min bei 4°C
<b>Oxotremorin (1,7 nM)</b>	mAChR – M <sub>2</sub>	Carbamylcholinchlorid (10 µM)	20 mM Hepes-Tris (pH: 7,5) + 10 mM MgCl <sub>2</sub>	20 min bei RT	60 min bei RT	2x2 min bei 4°C
<b>AF-DX 384 (5 nM)</b>	mAChR – M <sub>2</sub>	Atropinsulfat (100 µM)	Krebs-Puffer (pH: 7,4) 4,7 mM KCl + 120 mM NaCl + 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> + 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 5,6 mM D- Glukose + 25 mM NaHCO <sub>3</sub> + 2,5 mM CaCl <sub>2</sub>	15 min bei RT	60 min bei RT	3x4 min bei 4°C
<b>4-DAMP (1 nM)</b>	mAChR – M <sub>3</sub>	Atropinsulfat (10 µM)	50 mM Tris-HCl (pH: 7,4) + 0,1 mM PMSF + 1 mM EDTA	15 min bei RT	45 min bei RT	2x5 min bei 4°C

## 2.5 Messung der RD mit MCID™ Analysis

Die digitalisierten, autoradiographisch gefertigten Hirnschnittbilder wurden zur densitometrischen Vermessung mit Hilfe des Programms MCID™ Analysis Version 7.0 der Firma InterFocus Imaging LTD (Linton, GB) bearbeitet. Die Software bietet dabei eine interaktive Benutzeroberfläche, welche manuell durch Maus und Tastatureingaben zu bedienen ist. Dabei präsentiert sich dem Anwender ein zweigeteiltes Interface. Auf der linken Seite kann der Benutzer über diverse Funktionen, graphischen Tools und Operationen in unterschiedlichen Auswahlmenüs verfügen. Ebenfalls bietet der linke Bereich der Benutzeroberfläche Platz für die manuelle Vermessung ausgewählter Einzelbilder. Auf der rechten Seite hingegen sind benutzerdefiniert die einzelnen *Channels* aufgeführt, in welche die entsprechenden Bilderserien geladen werden können. Die Aufteilung der rechten Interfaceseite kann dabei manuelle unter der Option *Settings* und *Display Format* individuell verändert werden. Vor Beginn der Bestimmung der kalibrierten Dichte (CD) war dabei die Umstellung von MCID™ in den Modus *Receptor Binding* erforderlich. Dieser musste vor jeder neu beginnenden Sitzung in der Menüleiste unter *Settings* und anschließender Auswahl des Unterpunktes *Study* mit einem Mausklick auf *Receptor Binding* ausgewählt werden, was in einem Haken hinter der entsprechenden Funktion angezeigt wird. Um mit MCID™ die CD aus den autoradiographischen Schnittbildern berechnen zu können, musste zunächst eine linear interpolierte Kalibrierungskurve erstellt werden. Dafür war das *Calibration Icon* in der linken Menüleiste als Operation und anschließend die Option *Cal stds* (Calibration Standards) auszuwählen. Die *Standards unit* wurde von [nCi/g] auf [fmol/mg] geändert. Um einen Funktionsgraphen generieren zu können, sind am Hirnforschungszentrum in Jülich ermittelte standardisierte Kalibrierungstabellen verwendet worden. Diese Tabellenwerte wurden in die Kalibrierungsfunktion übernommen und anschließend mittels einer kubischen Spline Funktion der Funktionsgraph erstellt (Abbildung 9). Dabei konnte nun jedem Grauwert eines Bildes, im Bereich von 0 bis 255, ein entsprechender kalibrierter Dichtewert zugeordnet werden, wobei im Bereich um 0 (dunkel bis schwarz) eine sehr hohe und im Bereich von 255 (hell bis weiß) eine sehr niedrige CD erwartet werden kann. Die Kalibrierungskurve war nun auf alle Kanäle zu übernehmen. Der nächste Schritt bestand in der Bestimmung des für jede Bildserie individuellen Hintergrundwertes. Dazu wurde ein *Total Binding* Bild der entsprechenden Bildserie in den Kanal 1 (im Programm mit *Ch1* im *Image View* gekennzeichnet) durch den Befehl *Retrieve Image* im Menüpunkt *Image* der *Standard Bar* geladen, da nur in diesem Kanal aufgrund programmspezifischer Standards, eine Anwendung

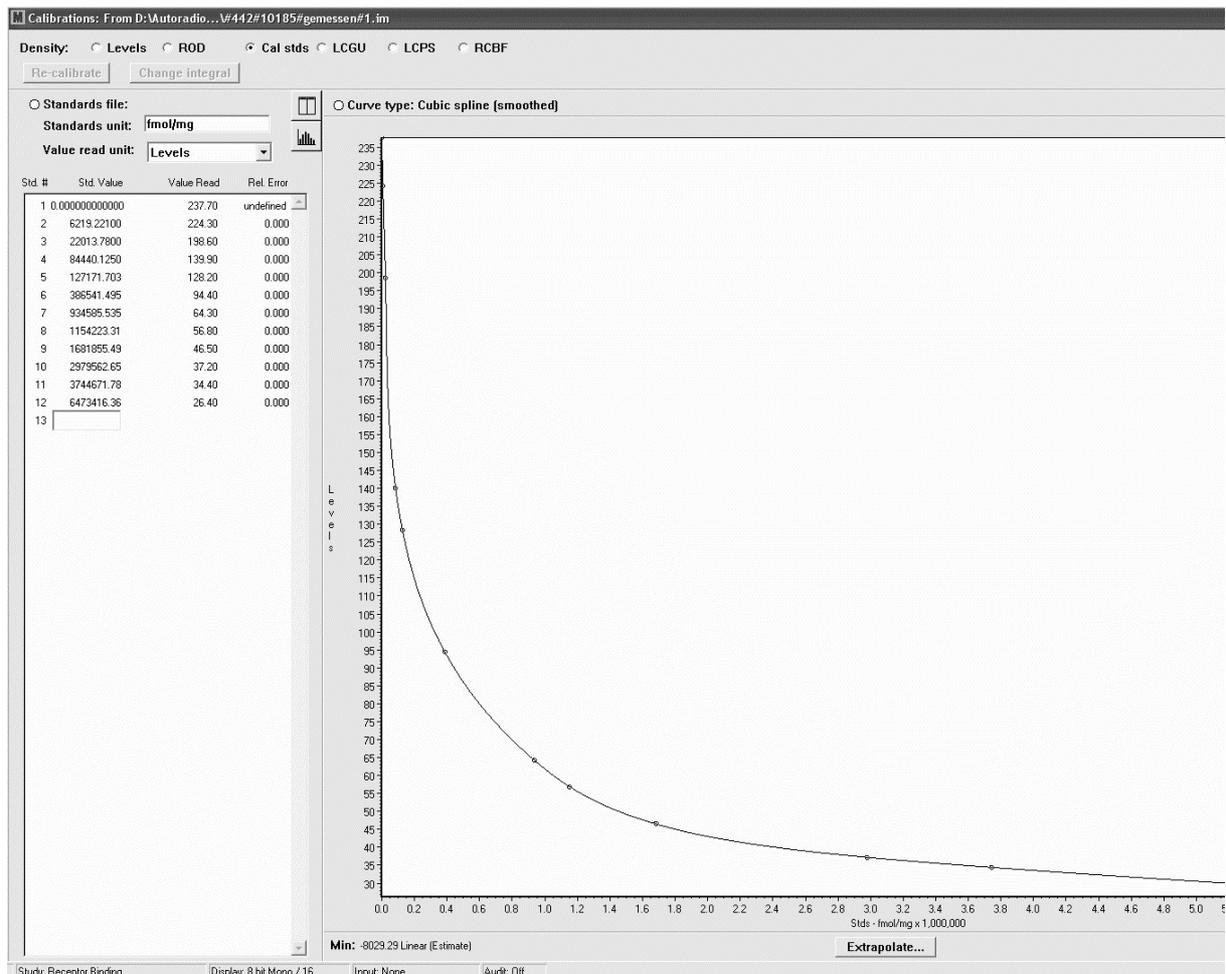


Abbildung 9: Kalibrierungskurve der vordefinierten Standards

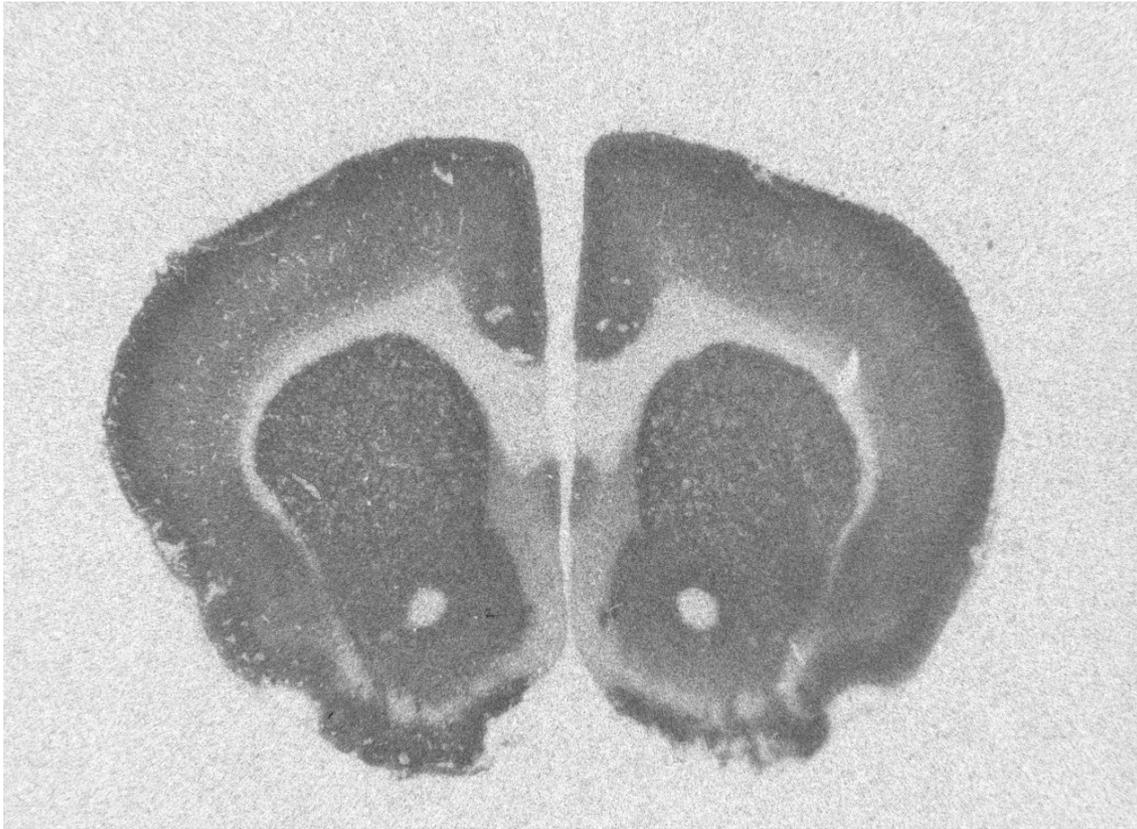
von Messungen möglich ist. Allerdings musste an dieser Stelle darauf geachtet werden, den Dateityp in der *Retrieve Image* Funktion von „TIFF 5 (\*.tif)“ auf „TIFF (\*.tif)“ zu ändern, da die zu ladenden Bilddateien im entsprechenden letztgenannten Format abgespeichert waren. Weiterhin war es erforderlich innerhalb der *Components* (direkt unterhalb der Drop-down Auswahl des Dateitypes) alle Haken, mit Ausnahme des *Image* - Häkchens zu entfernen, um so Interferenzen mit den bereits vorkalibrierten Kanälen zu vermeiden. Mit Hilfe der *Click-outline* Funktion aus der *Image Tools Bar* wurde anschließend ein Hintergrundbereich außerhalb jeglicher anatomische Hirnstrukturen oder Präparationsartefakte manuell umfahren. Das Programm errechnete nun für diesen Hintergrund eine mittlere CD, welche im Folgenden stets von den ermittelten Messwerten aus einer CPU – Region subtrahiert wurde, um hintergrund-korrigierte Messwerte zu erhalten. Dieser Hintergrundwert wurde als Bilddatei für den Rest der Messung einer Bildserie in den Kanal 2 (im Programm mit *Ch2* im *Image View* gekennzeichnet) dargestellt. Die restlichen Bilder einer Serie konnten nun in die Kanäle

3 bis 8 geladen werden. Um auch diese Schnittbilder einer nachfolgenden Rezeptordichtemessung zugänglich zu machen, erfolgte zunächst eine Übertragung der Kalibrierung auf die o.g. Kanäle bis zur Position 8 im *Image View*. Die jetzt kalibrierten Bilder einer Serie wurden abschließend im Format „\*.im“ gespeichert. Der zweite Schritt vor Beginn der eigentlichen Messung umfasste die korrekte Erstellung der Ergebnistabelle in MCID™. Dafür wurde im Seitenmenü die Operation *Sample* ausgewählt, worauf hin bereits voreingestellte Standardtabelle mit vier Spalten angezeigt werden. Um die restlichen Spalten zu ergänzen, wurde unter dem Menüpunkt *Sample* der *Standard Bar* der Unterpunkt *Measures selection* aufgerufen. In dem jetzt angezeigten Programmfenster wurden unter dem Drop-Down Menü *Basic Morphometry* die Parameter *Area* und *Perimeter* mittels Doppelklick ausgewählt und mit dem OK-Button bestätigt. Der Tabellenkopf umfasste nun die folgenden 6 Spalten: *Total Binding* (Tot Bind – [fmol/mg]); *Non-specific Binding* (NS Bind – [fmol/mg]); *Specific Binding* (S Bind – [fmol/mg]); *Specific Binding* (S Bind - % [fmol/mg]); *Area* – [pixel]; *Perimeter* – [pixel] (Abbildung 10).

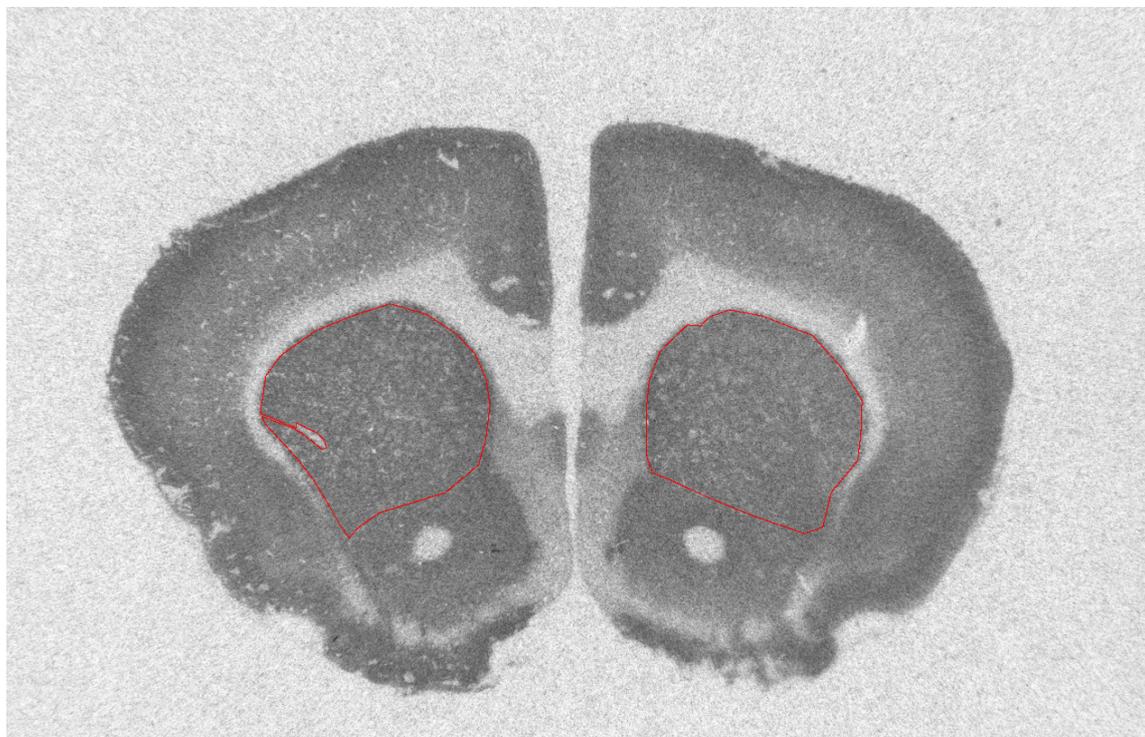
Section	Region	Target	Ch 1	Ch 2	Ch 2	Ch 2	Ch 1	Ch 1
			Tot Bind - fmol/mg	NS Bind - fmol/mg	S Bind - fmol/mg	S Bind - % (fmol/mg)	Area - pixel	Perimeter - pixel
Section 1	CPu RIGHT	1	1.5169e+005	111.11795632	1.5158e+005	99.92674528	421397.000	2610.052
	CPu LEFT	1	1.8815e+005	111.11795632	1.8804e+005	99.94094151	409253.000	2400.542
Section 2	CPu RIGHT	1	1.4703e+005	111.11795632	1.4692e+005	99.92442439	329260.000	5141.108
	CPu LEFT	1	1.6501e+005	111.11795632	1.6490e+005	99.93266168	286989.000	3827.771
Section 3	CPu RIGHT	1	1.3858e+005	111.11795632	1.3847e+005	99.91981829	206876.000	5025.292
	CPu LEFT	1	1.7450e+005	111.11795632	1.7439e+005	99.93632228	236680.000	4337.638
Section 4	CPu RIGHT	1	1.5062e+005	111.11795632	1.5051e+005	99.92622590	65493.000	3368.811
	CPu LEFT	1	1.5853e+005	111.11795632	1.5842e+005	99.92990598	82599.000	3228.821
Section 5	CPu RIGHT	1	1.7200e+005	111.11795632	1.7189e+005	99.93539780	42211.000	1762.408
	CPu LEFT	1	1.5507e+005	111.11795632	1.5496e+005	99.92834482	51737.000	2599.292
Section 6	CPu RIGHT	1	1.7054e+005	111.11795632	1.7043e+005	99.93484295	32389.000	1639.756
	CPu LEFT	1	1.6306e+005	111.11795632	1.6295e+005	99.93185479	40212.000	1750.071
Mean			1.6188e+005	111.11795632	1.6177e+005	99.93069723	183674.667	3140.963
SD			7.6216e+004	0.00000000	1.6080e+004	0.00669268	150024.511	1233.132

**Abbildung 10: Ergebnistabelle mit den CD eines Tieres für den Liganden AF-DX 384.** Dargestellt sind die Messungen von insgesamt 6 Autoradiogrammen für jeweils das rechts und linke CPu eines Hirnschnittes. Erfasst wurden: Totale Bindung (Tot Bind [fmol/mg]); Nicht-spezifische Bindung (NS Bind [fmol/mg]); Spezifische Bindung (S Bind [fmol/mg]); Fläche (Area [pixel]) und Umfang (Perimeter [pixel])

Die graphische Messung der einzelnen Schnittbilder erfolgte nun jeweils für das rechte und linke CPu. Dazu ist ebenfalls mit der zuvor verwendeten Funktion *Click-outline* aus der *Sample Bar* eine kontinuierliche Linie um die auszuwertende Hirnstruktur, also das CPu der rechten oder linken Hemisphäre, gezogen worden, sodass eine geschlossene Fläche konstruiert wurde (Abbildung 11 und 12).

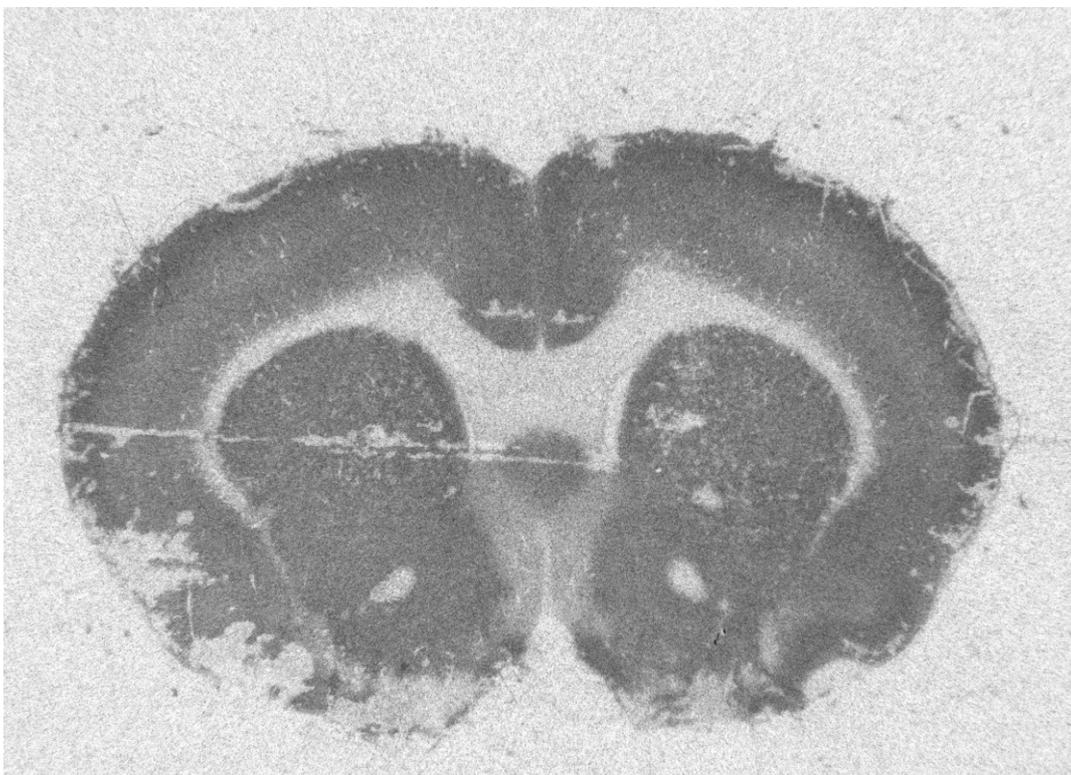


**Abbildung 11: Autoradiogramm eines Hirnschnittes auf Schnittebene 1 vor der Bearbeitung in MCID™**

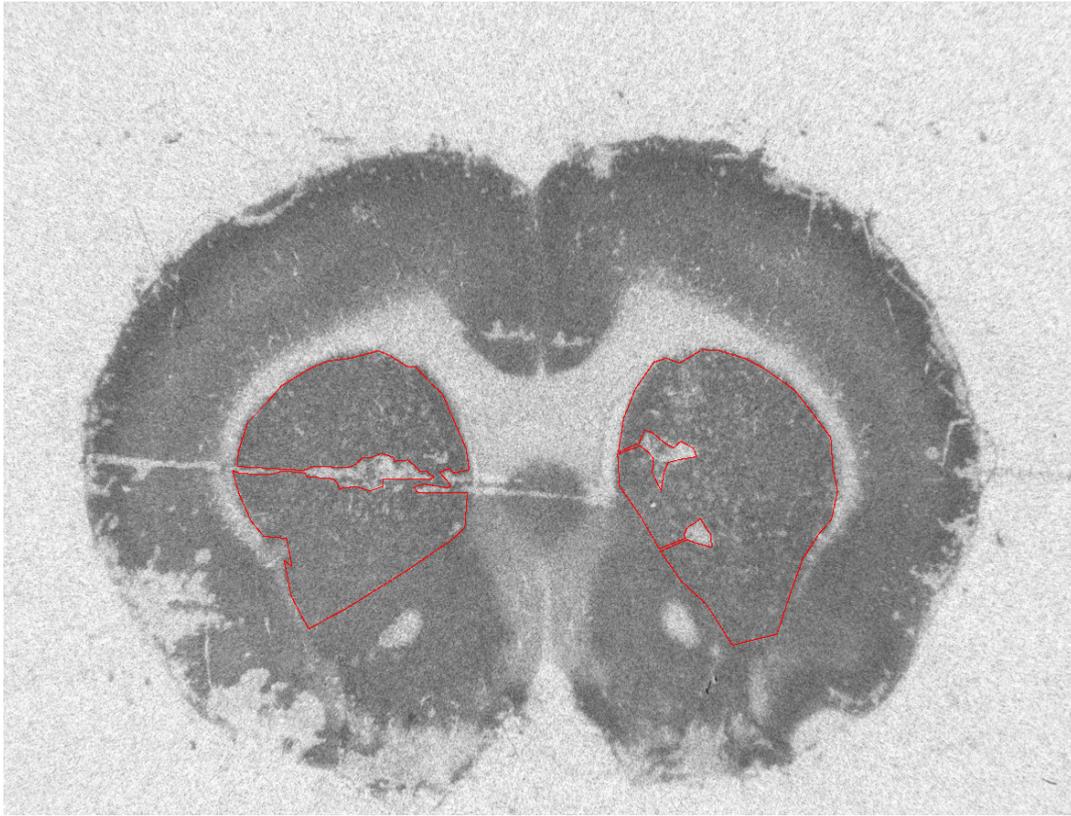


**Abbildung 12: Autoradiogramm eines Hirnschnittes auf Schnittebene 1 nach der Bearbeitung in MCID™**

Präparationsartefakte innerhalb des zu messenden Hirnareals sind hierbei unter Abschätzung geeigneter Konturlinien bei den einzelnen Messungen ausgespart worden (Abbildung 13 und 14). Das Programm errechnete aus dem graphischen abgegrenzten Areal eine spezifische CD in absoluten und relativen Werten sowie die Pixel für Area und Perimeter und verzeichnete diese in der Ergebnistabelle. Abwechselnd sind so das rechts- und linksseitige CPu von jedem Bild einer Serie vermessen worden. Um eine schlüssige Datenerhebung zu gewährleisten, war darauf zu achten, die vermessenen Bilder mit der verwendeten Kalibrierung und den gesetzten Vermessungslinien zu speichern. Im Anschluss wurde die Ergebnistabelle als „lg2 – Datei“ gespeichert.



**Abbildung 13: Autoradiogramm eines Hirnschnittes auf Schnittebene 1 vor der Bearbeitung in MCID™ mit Artefakten im Messbereich. Im Messbereich sind streifenförmige Aufhellung als Bildartefakte sichtbar**



**Abbildung 14: Autoradiogramm eines Hirnschnittes auf Schnittebene 1 nach der Bearbeitung in MCID™ mit Artefakten außerhalb des Messbereichs. Der Messbereich innerhalb des CPU ist rot markiert worden. Artefakte wurden größtmöglich aus dem Messbereich ausgespart**

## 2.6 Auswertung mit LibreOffice Calc

Die mit MCID™ ermittelten Messwerte wurden nach vollständiger Erfassung in das Tabellenkalkulationsprogramm LibreOffice Calc übertragen. Um die weitere Bearbeitung der Datensätze zu vereinfachen, sind die Ergebniszeilen der in MCID™ generierten Tabelle zunächst von einer spaltenweisen Anordnung in eine zeilenweise Darstellung transformiert worden. Die Berechnung der mittleren RD erfolgte dabei in 4 Schritten:

1. Aus den gemessenen CD der Autoradiogramme wurden zunächst die RD für jedes einzelne Schnittbild eines Tieres unter Verwendung folgender Formel berechnet, wobei CD die gemessene kalibrierte Dichte,  $KD$  die Dissoziationskonstante des Liganden,  $L$  die Realkonzentration des Liganden und  $SA$  die ligandenspezifische Aktivität sind (Formel 1):

$$RD [fmol/mg] = \frac{\frac{CD}{SA [Ci/mmol]} * (KD [nM] + L [nM])}{L [nM]}$$

- Die so berechneten RD wurden mit der jeweiligen gemessenen Area multipliziert, um die area-gewichtete RD eines Schnittbildes zu generieren (Formel 2):

$$area\ RD = RD * Area$$

- Die area-gewichtete RD des jeweils linken und rechten CPU eines Tieres wurde anschließend aus den RD der Schnittbilder wie folgt berechnet (Formel 3) :

$$\bar{x}(area\ RD) = \frac{\sum area\ RD}{\sum Area}$$

- Abschließend wurde der area-gewichtete Mittelwert der RD aller Tiere einer Untergruppe berechnet, wobei  $n$  die Tierzahl pro Untergruppe darstellt (Formel 4):

$$MW\ area\ RD = \frac{\sum \bar{x}(area\ RD)}{n}$$

## 2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Statistik-Software SPSS Statistics Version 20 der Firma IBM. Durchgeführt wurde eine univariate Varianzanalyse. Eine Testung auf Normalverteilung der Datensätze ist ausgeführt worden. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p$ -Wert  $< 0,05$  festgelegt. Als Post-Hoc-Test für die Mehrfachvergleiche und Signifikanzkorrektur der Mittelwerte der einzelnen Schnittserien jeweils für die linke und rechte Messseite wurde die Bonferroni-Korrektur gewählt. Alle Ergebnisse werden im Folgenden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben, sofern nicht anders ausgewiesen.

## 2.8 Erstellung der Streudiagramme mit Origin®

Die graphische Darstellung der relativen RD in Streudiagrammen, erfolgte mit Hilfe der Datenanalyse- und Grafiksoftware Origin® Version 8,1G (OriginLab Northampton, Massachusetts, USA). Die relativen RD wurden dabei für jedes Tier einer Untergruppe der jeweiligen Liganden anhand folgender Formel berechnet (Formel 5):

$$relative\ RD = \frac{100 * (R - L)}{L}$$

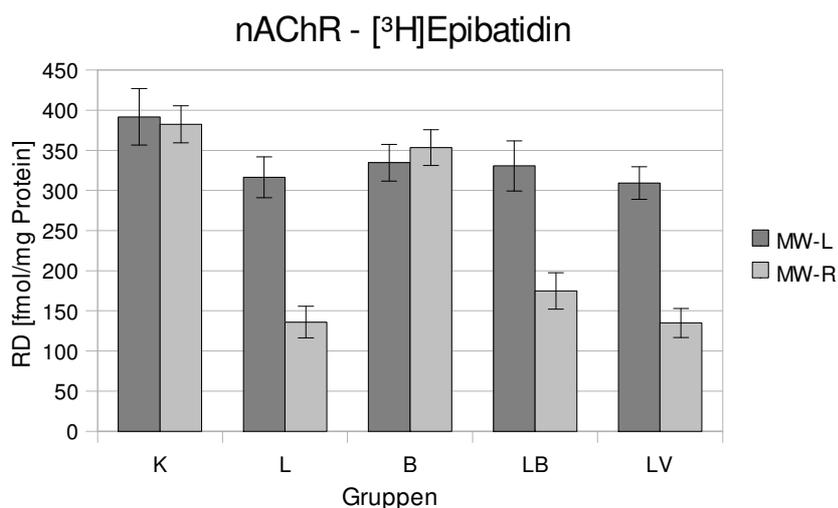
Dabei sind  $R$  die mittlere area-gewichtete RD eines Tieres gem. Formel 3 des rechten CPU und  $L$  die mittlere area-gewichtete RD eines Tieres gem. Formel 3 des linken CPU.

### 3. Ergebnisse

Die Erhebung der RD von nAChR und mAChR mit den Liganden [<sup>3</sup>H]Epibatidin (nAChR), [<sup>3</sup>H]Pirenzepin (mAChR M<sub>1</sub>), [<sup>3</sup>H]Oxotremorin (mAChR M<sub>2</sub>, Agonist), [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 (mAChR M<sub>2</sub>, Antagonist) und [<sup>3</sup>H]4-DAMP (mAChR M<sub>3</sub>) umfasste die Auswertung der Schnittbilder von insgesamt einhundert achtzehn bzw. einhundert neunzehn Versuchstieren. Hierbei ist eine seitengetrennte Messung des jeweils linken und rechten CPu der 5 Versuchsgruppen erfolgt. Unter Berücksichtigung der zeitlichen Staffelung der Entnahme der Rattenhirne können die Messdaten von insgesamt achtzehn genau durch Maßnahme und Zeitpunkt charakterisierten Untergruppen präsentiert werden.

#### 3.1 nAChR - [<sup>3</sup>H]Epibatidin

Für einen Überblick wurden zunächst die Mittelwerte der area-gewichteten RD aller Untergruppen zusammengefasst und als mittlere RD der Gruppen K, L, B, LB und LV dargestellt. Aus Diagramm 1 wird ersichtlich, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe (391,59 ± 35,22 [fmol/mg Protein] links und 382 ± 23,06 [fmol/mg Protein] rechts) in den Gruppen L, LB und LV eine Verminderung der gemittelten RD im jeweils linken und rechten CPu ipsilateral zur Kontrolle vorliegt (L: 316,41 ± 25,35 [fmol/mg Protein] links und 135,95 ± 19,75 [fmol/mg Protein] rechts; LB: 334,6 ± 22,82 [fmol/mg Protein] links und 174,76 ± 22,54 [fmol/mg Protein] rechts; LV 309,29 ± 20,43 [fmol/mg Protein] links und 134,82 ± 18,22 [fmol/mg Protein] rechts), wobei die Reduktion der RD im rechten CPu höher ist.

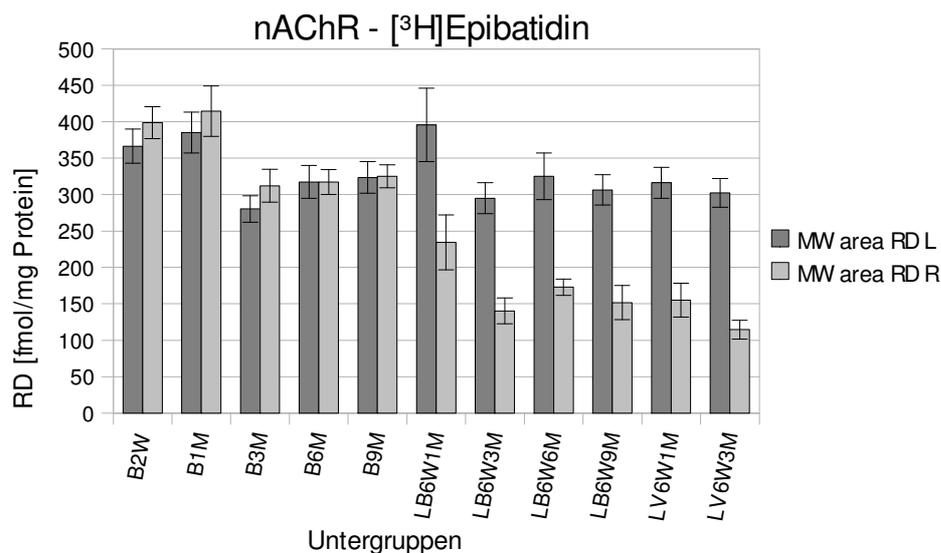


**Diagramm 1: Mittelwerte der area-gewichteten RD ± SD der Gruppen K, L, B, LB und LV.** MW-L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichten linkes CPu einer Gruppe; MW-R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu einer Gruppe. Gruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

Auch in der Gruppe B kann eine Reduktion der RD sowohl im linken als auch im rechten CPU im Vergleich zur Kontrollgruppe erkannt werden (B:  $334,16 \pm 22,82$  [fmol/mg Protein] links und  $353,54 \pm 22,32$  [fmol/mg Protein] rechts). Diese ist allerdings um ein Vielfaches geringer als in den zuvor aufgeführten Gruppen.

### 3.1.1 Ergebnisse der Gruppe L

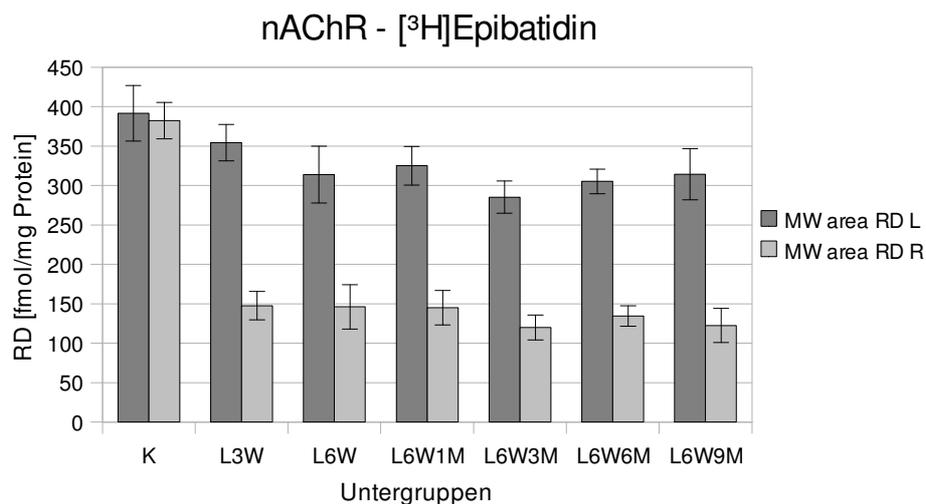
Die Ergebnisse der Gruppe L sind im Diagramm 2 dargestellt. Für das linke CPU zeigt sich eine Reduktion der RD im ipsilateralen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $392 \pm 35$  [fmol/mg Protein] links) in allen Untergruppen (L3W:  $354 \pm 23$  [fmol/mg Protein] links; L6W:  $314 \pm 36$  [fmol/mg Protein] links; L6W1M:  $325 \pm 25$  [fmol/mg Protein] links; L6W3M:  $285 \pm 20$  [fmol/mg Protein] links; L6W6M:  $305 \pm 16$  [fmol/mg Protein] links und L6W9M:  $314 \pm 32$  [fmol/mg Protein] links). Statistische Signifikanz wurde hierbei in den Untergruppen L6W, L6W1M, L6W3M, L6W6M und L6W9M, nicht aber in L3W erreicht. Die Ergebnisse der Messung des rechten CPU zeigen stets eine Reduktion der RD ipsilateral zur Kontrolle ( $382 \pm 23$  [fmol/mg Protein] rechts) um mindestens 53% in allen Untergruppen (L3W:  $148 \pm 18$  [fmol/mg Protein] rechts; L6W:  $146 \pm 28$  [fmol/mg Protein] rechts; L6W1M:  $145 \pm 22$  [fmol/mg Protein] rechts; L6W3M:  $120 \pm 16$  [fmol/mg Protein] rechts; L6W6M:  $135 \pm 13$  [fmol/mg Protein] rechts; L6W9M:  $122 \pm 22$  [fmol/mg Protein] rechts). Das statistische Signifikanzniveau wurde hierbei stets erreicht. Auch ist die RD des rechten CPU jeder der genannten Untergruppen signifikant niedriger als im kontralateralen CPU der jeweiligen Untergruppe.



**Diagramm 2: Mittelwerte der area-gewichteten RD  $\pm$  SD der Gruppen B, LB und LV im zeitlichen Verlauf.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPU; MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPU. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

### 3.1.2 Ergebnisse der Gruppen B , LB und LV

In der Gruppe B zeigt sich in allen Untergruppen eine Verminderung der RD des linken CPU im ipsilateralen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K:  $392 \pm 35$  [fmol/mg Protein] links; B2W:  $367 \pm 23$  [fmol/mg Protein] links; B1M:  $385 \pm 28$  [fmol/mg Protein] links; B3M:  $280 \pm 18$  [fmol/mg Protein] links; B6M:  $317 \pm 23$  [fmol/mg Protein] links; B9M:  $324 \pm 22$  [fmol/mg Protein] links). Dabei wird das Signifikanzniveau in den Untergruppen B3M, B6M und B9M, nicht jedoch von B2W und B1M erreicht. Im jeweils rechten CPU kann im Vergleich zur Kontrolle ( $382 \pm 23$  [fmol/mg Protein] rechts) eine Zunahme der RD in den Untergruppen B2W ( $399 \pm 22$  [fmol/mg Protein] rechts) und B1M ( $415 \pm 35$  [fmol/mg Protein] rechts) gemessen werden. Die Untergruppen B3M, B6M und B9M zeigen hierbei hingegen eine Reduktion der RD im rechten CPU (B3M:  $312 \pm 22$  [fmol/mg Protein] rechts; B6M:  $317 \pm 17$  [fmol/mg Protein] rechts; B9M:  $325 \pm 16$  [fmol/mg Protein] rechts). Diagramm 3 illustriert hierzu die entsprechenden Daten.



**Diagramm 3: Mittelwerte der area-gewichteten RD  $\pm$  SD der Gruppe L im zeitlichen Verlauf.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPU; MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPU. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

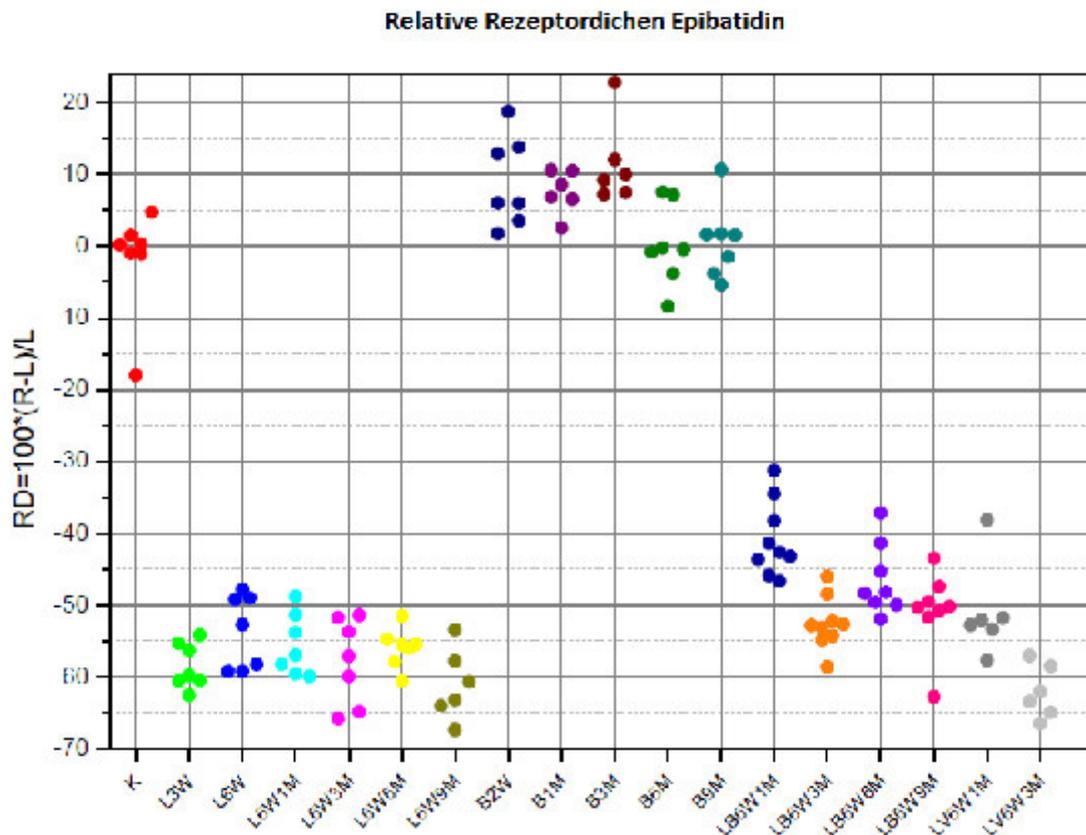
Signifikant sind dabei die Reduktionen der RD in den Untergruppen B3M, B6 und B9M, nicht hingegen in den Untergruppen B2W und B1M. Im interhemisphärischen Vergleich der RD liegen keine statistisch signifikanten Änderungen der RD vor. Die Ergebnisse der Gruppe LB zeigen für das linke CPU eine Reduktion der RD im ipsilateralen Vergleich zur Kontrollgruppe in den Untergruppen LB6W3M ( $295 \pm 21$  [fmol/mg Protein] links), LB6W6M ( $325 \pm 32$  [fmol/mg Protein] links) und LB6W9M ( $306 \pm 21$  [fmol/mg Protein] links). In der Untergruppe LB6W1M liegt die gemessene RD (LB6W1M:  $396 \pm 50$  [fmol/mg

Protein] links) über dem ipsilateralen Kontrollwert. Dabei sind die Messergebnisse der Untergruppen LB6W3M, LB6W6M und LB6W9M, nicht aber für LB6W1M signifikant. Für das rechte CPu zeigt sich in allen Untergruppen verglichen mit dem ipsilateralen Kontrollwert eine Reduktion der RD (LB6W1M:  $234 \pm 38$  [fmol/mg Protein] rechts; L6W3M:  $140 \pm 18$  [fmol/mg Protein] rechts; LB6W6M:  $173 \pm 11$  [fmol/mg Protein] rechts; LB6W9M:  $152 \pm 13$  [fmol/mg Protein] rechts). Dabei wird sowohl in allen Vergleichen mit den ipsilateralen Kontrollen, als auch interhemisphärisch zwischen linkem und rechtem CPu innerhalb der jeweiligen Untergruppen statistische Signifikanz erreicht. Bei der Gegenüberstellung der Gruppen L und LB zeigt sich eine signifikante Differenz der RD im rechten CPu zwischen den Untergruppen L6W1M und LB6W1M. Zwischen den anderen zeitlich gepaarten Untergruppen L6W3M und LB6W3M, L6W6M und LB6W6M sowie L6W9M und LB6W9M ergeben sich keine statistisch signifikanten Differenzen in der RD im rechten CPu. Tendenziell weist die Gruppe LB aber höhere RD im rechten CPu auf, als die Gruppe L. Auch in der Gruppe LV sind, bezogen auf die Kontrollwerte, signifikante Reduktionen der RD für das linke (LV6W1M:  $316 \pm 21$  [fmol/mg Protein] links; LV6W3M:  $302 \pm 20$  [fmol/mg Protein] links) und das rechte (LV6W1M:  $155 \pm 23$  [fmol/mg Protein] rechts; LV6W3M:  $115 \pm 13$  [fmol/mg Protein] rechts) CPu gemessen worden. Ebenfalls signifikant ist hierbei die Differenz der RD zwischen linkem und rechtem CPu innerhalb der beiden Untergruppen. Bei der Gegenüberstellung der Gruppen LB und LV liegt eine signifikante Differenz der RD im rechten CPu zwischen den Untergruppen LB6W1M und LV6W1M vor, nicht jedoch zwischen LB6W3M und LV6W3M. Als ebenfalls signifikant erweist sich die Differenz der RD zwischen LB6W6M und LV6W3M im rechten CPu.

### **3.1.3 Relative Rezeptordichten**

Um interhemisphärische Veränderungen der RD zwischen linkem und rechtem CPu innerhalb einer Untergruppe und im zeitlichen Verlauf zu verdeutlichen, werden im Folgenden Streudiagramme mit relativen RD präsentiert. Die Ergebnisse für den Liganden [<sup>3</sup>H]Epibatidin sind hierbei in Diagramm 4 dargestellt. Die gemessenen absoluten, area-gewichteten Mittelwerte der RD des läsionierten und ggf. mit BoNT-A oder BV behandelten rechten CPu eines Tieres sind dabei ins Verhältnis zum jeweils kontralateralen linken CPu gesetzt. In der Gruppe K ist zumeist eine Verteilung der relativen RD um 0 herum erkennbar. Der Streubereich liegt für 6 von 7 Werten bei -1,1 bis 4,74. Einzige Ausnahme stellt ein Extremwert mit -17,98 dar. Dies ist jedoch insgesamt Ausdruck einer geringen

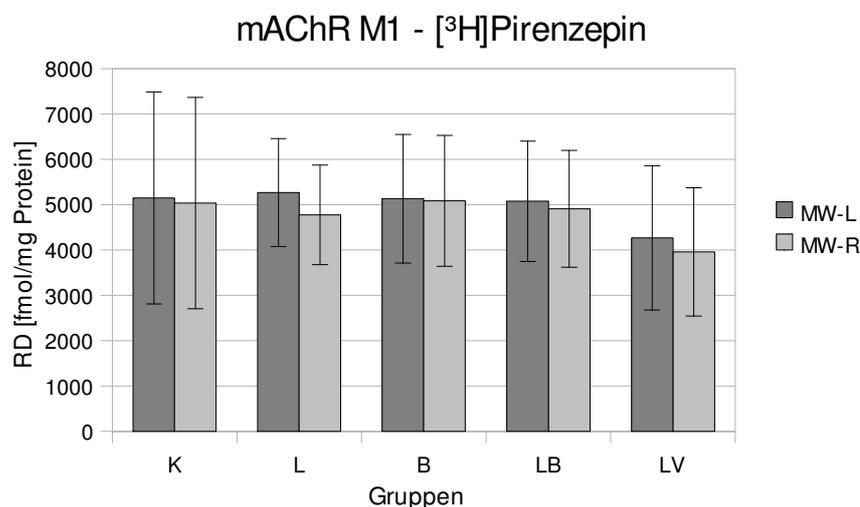
interhemisphärischen Differenz der Absolutwerte. In der Gruppe L zeigt sich eine relative RD zwischen -47,77 und -67,4, was mit einer Abnahme der absoluten RD im rechten CPU assoziiert ist. Dabei sind Sechsenddreißig Werte negativer als -50, nur 4 Werte sind positiver. Dieser Effekte besteht konstant über alle Untergruppen fort. In der Gruppe B zeigt sich eine Verschiebung der relativen RD sowohl in den positiven und teilweise auch negativen Wertebereich, mit einer Streuung von -8,4 bis 22,81. Fünfundzwanzig von Dreiunddreißig Relativwerten sind hierbei im positiven Wertebereich verteilt. Für die Gruppe LB sind ebenfalls Verschiebungen in den negativen Wertebereich erkennbar, allerdings geringer ausgeprägt als in der Gruppe L. Die Streubreite erstreckt sich von -62,75 bis -31,3. Zwölf Werte sind negativer als -50, einundzwanzig Werte sind positiver als -50. Auch in der Gruppe LV ist eine Verschiebung der relativen RD in den negativen Wertebereich erkennbar. Dabei verteilen sich die Einzelwerte in einem Streuintervall von -38,18 bis -66,54.



**Diagramm 4: Relative RD aller Untergruppen im zeitlichen Verlauf für die nAChR - [<sup>3</sup>H]Epibatidin.**  
 RD: hier relative Rezeptordichte; R: area-gewichtet Rezeptordichte rechtes CPU eines Tieres; L: area-gewichtete Rezeptordichte linkes CPU eines Tieres. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

### 3.2 mAChR M<sub>1</sub> - [<sup>3</sup>H]Pirenzepin

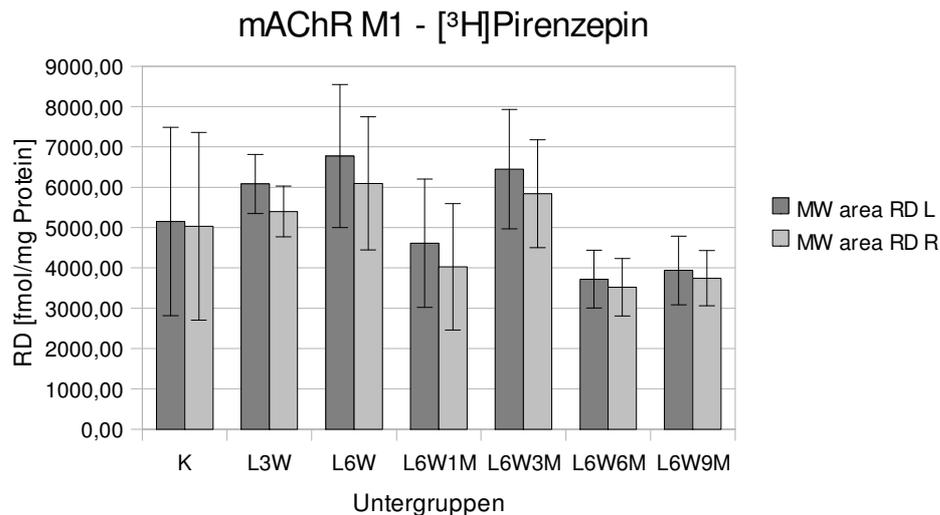
Diagramm 5 zeigt eine Zusammenfassung der area-gewichteten RD aller Untergruppen, welche als gemittelte RD der jeweiligen Gruppen K, L, B, LB und LV dargestellt sind. Dabei ergeben sich für das linke CPu (K: 5149,24 ± 2335,46 [fmol/mg Protein] links; L: 5262,54 ± 1189,99 [fmol/mg Protein] links; B: 5130,4 ± 1417,96 [fmol/mg Protein] links; LB: 5072,99 ± 1327,96 [fmol/mg Protein] links; LV: 4268,45 ± 1590,7 [fmol/mg Protein] links) stets größere RD als für das rechte CPu (K: 5035,26 ± 2327,61 [fmol/mg Protein] rechts; L: 4771,91 ± 1097,56 [fmol/mg Protein] rechts; B: 5082,71 ± 1443,2 [fmol/mg Protein] rechts; LB: 4904,89 ± 1287,73 [fmol/mg Protein] rechts; LV: 3958,29 ± 1417,13 [fmol/mg Protein] rechts).



**Diagramm 5: Mittelwerte der area-gewichteten RD ± SD der Gruppen K, L, B, LB und LV.** MW-L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu einer Gruppe; MW-R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu einer Gruppe. Gruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

#### 3.2.2 Ergebnisse der Gruppe L

Diagramm 6 illustriert die Veränderungen der RD der Gruppe L im zeitlichen Verlauf. Dabei zeigt sich im linken CPu eine Verminderung der RD ipsilateral zur Kontrollgruppe (5149,24 ± 2335,46 [fmol/mg Protein] links) in den Untergruppen L6W1M (4613,19 ± 1588,59 [fmol/mg Protein] links), L6W6M (3719,55 ± 716,12 [fmol/mg Protein] links) und L6W9M (3937,35 ± 849,81 [fmol/mg Protein] links). Konträr dazu kann eine Zunahme der RD in den Untergruppen L3W (6082,50 ± 733,29 [fmol/mg Protein] links), L6W (6775,35 ± 1772,35 [fmol/mg Protein] links) und L6W3M (6447,33 ± 1479,76 [fmol/mg Protein] links)

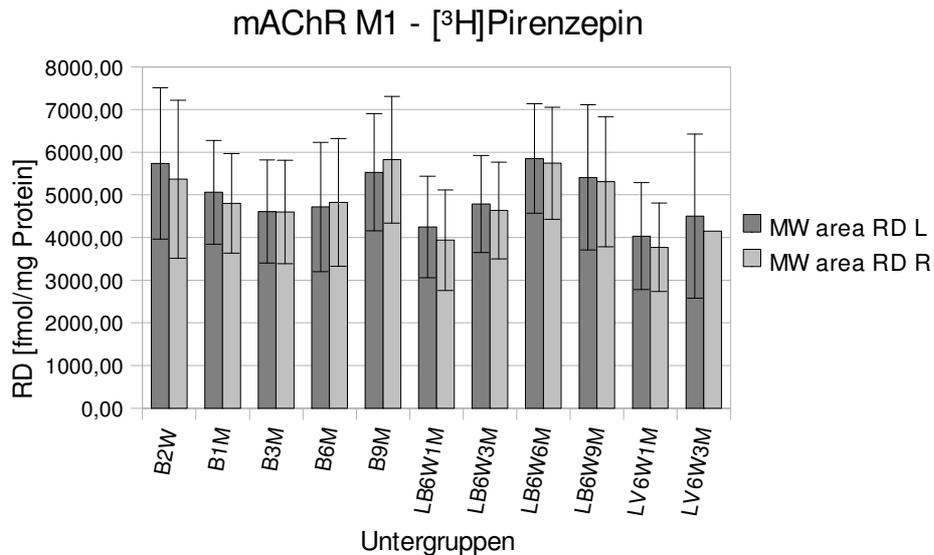


**Diagramm 6: Mittelwerte der area-gewichteten RD  $\pm$  SD der Gruppe L im zeitlichen Verlauf.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu; MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

beobachtet werden. Statistisch signifikante Differenzen sind hierbei nicht vorhanden. Für das rechte CPu ergibt sich im ipsilateralen Vergleich zur Kontrolle ( $5035,26 \pm 2327,61$  [fmol/mg Protein] rechts) ebenfalls eine Verminderung der RD für die Zeitintervalle 6W1M ( $4027,76 \pm 1563,53$  [fmol/mg Protein] rechts), 6W6M ( $3521,70 \pm 715,55$  [fmol/mg Protein] rechts) und 6W9M ( $3745,37 \pm 686,20$  [fmol/mg Protein] rechts). Weiterhin zeigt sich eine Zunahme der RD in den Untergruppen L3W ( $5398,68 \pm 630,57$  [fmol/mg Protein] rechts), L6W ( $6097,42 \pm 1647,71$  [fmol/mg Protein] rechts) und L6W3M ( $5840,55 \pm 1341,82$  [fmol/mg Protein] rechts). Auch hierbei sind keine statistisch signifikanten Differenzen vorhanden. Ebenfalls liegen keine signifikanten Differenzen der RD im interhemisphärischen Vergleich vor.

### 3.2.3 Ergebnisse der Gruppen B, LB und LV

Diagramm 7 stellt die area-gewichteten mittleren RD der Gruppen B, LB und LV dar. Die Ergebnisse der Gruppe B zeigen für das linke CPu im ipsilateralen Vergleich zur Gruppe K eine Verminderung der RD in den Untergruppen B1M ( $5061,47 \pm 1215,36$  [fmol/mg Protein] links), B3M ( $4609,03 \pm 1206,71$  [fmol/mg Protein] links) und B6M ( $4715,72 \pm 1516,23$  [fmol/mg Protein] links). In den Untergruppen B2W und B9M kann hingegen eine Zunahme der RD über den Kontrollwert hinaus gemessen werden (B2W:  $5736,81 \pm 1775,82$  [fmol/mg Protein] links; B9M:  $5528,98 \pm 1374,67$  [fmol/mg Protein] links). Das Signifikanzniveau wird jedoch für keinen Untergruppenvergleich erreicht. Für das rechte CPu zeigen die Messergebnisse eine Reduktion der RD im Abgleich mit der Kontrollgruppe in den



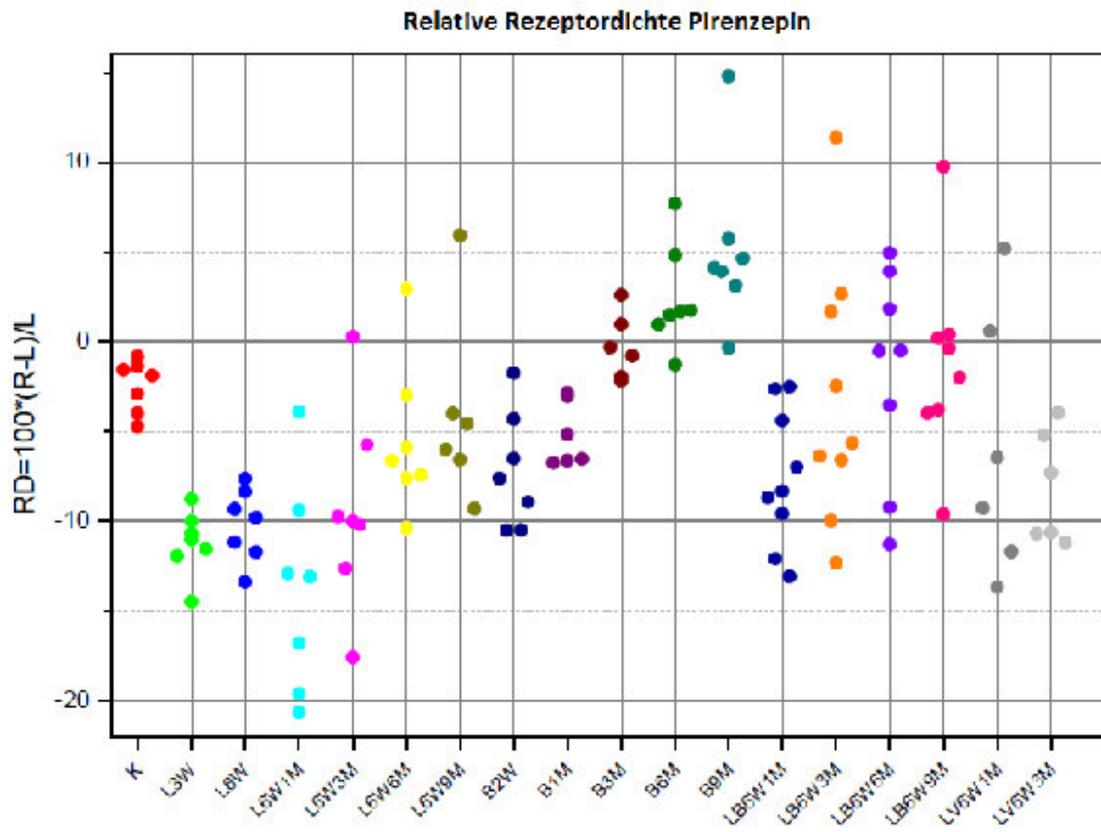
**Diagramm 7: Mittelwerte der area-gewichteten RD  $\pm$  SD der Gruppen B, LB und LV im zeitlichen Verlauf.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu; MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

Untergruppen B1M ( $4802,40 \pm 1167,80$  [fmol/mg Protein] rechts), B3M ( $4597,55 \pm 1211,41$  [fmol/mg Protein] rechts) und B6M ( $4820,23 \pm 1497,83$  [fmol/mg Protein]). Für die Untergruppen B2W und B9M zeigt sich hingegen eine Zunahme der RD (B2W:  $5368,12 \pm 1852$  [fmol/mg Protein] rechts; B9M:  $5825,26 \pm 1485,99$  [fmol/mg Protein] rechts). Eine statistisch relevante Veränderung der RD ergibt sich hierbei nicht. Auch im interhemisphärischen Seitenvergleich der einzelnen Untergruppen ergeben sich keine signifikanten Differenzen der RD zwischen linkem und rechtem CPu. Für die Gruppe LB zeigen die Ergebnisse des linken CPU im ipsilateralen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Reduktion der RD in den Untergruppen LB6W1M ( $4244,65 \pm 1188,77$  [fmol/mg Protein] links) und LB6W3M ( $4785,91 \pm 1139,34$  [fmol/mg Protein] links). Die RD der Untergruppen LB6W6M und LB6W9M übersteigen hingegen das Kontrollniveau (LB6W6M:  $5850,67 \pm 1283,07$  [fmol/mg Protein] links; LB6W9M:  $5410,70 \pm 1700,65$  [fmol/mg Protein] links). Das Signifikanzniveau wird hierbei allerdings in keiner Untergruppe erreicht. Für das rechte CPU kann den Messwerten eine Reduktion der RD ipsilateral zur Kontrolle ebenfalls in den Untergruppen LB6W1M ( $3938,41 \pm 1179,59$  [fmol/mg Protein] rechts) und LB6W3M ( $4632,74 \pm 1136,91$  [fmol/mg Protein] rechts) entnommen werden. Eine Zunahme der RD hingegen zeigt sich in den Untergruppen LB6W6M ( $5741,80 \pm 1314,32$  [fmol/mg Protein] rechts) und LB6W9M ( $5306,58 \pm 1520,07$  [fmol/mg Protein] rechts). Auch im interhemisphärischen Vergleich der RD ergibt sich keine statistisch signifikante Differenz. Bei

der Gegenüberstellung der Gruppen L und LB zeigen sich keine signifikanten Differenzen der RD zwischen dem jeweils rechten CPU der einzelnen Untergruppen. Für die Gruppe LV zeigt sich in den Ergebnissen des linken CPU im Abgleich mit der Gruppe K eine Verminderung der RD in beiden Untergruppen (LV6W1M:  $4034,20 \pm 1256,57$  [fmol/mg Protein] links und LV6W3M:  $4502,69 \pm 1924,83$  [fmol/mg Protein] links). Auch für das rechte CPU zeigt sich gemessen an den ipsilateralen Kontrollwerten eine Reduktion der RD in beiden Untergruppen (LV6W1M:  $3768,91 \pm 1037,00$  [fmol/mg Protein] rechts und LV6W3M:  $4147,67 \pm 1797,26$  [fmol/mg Protein] rechts). Statistisch Signifikante Differenzen werden jedoch weder für das linke noch für das rechte CPU erreicht. Ebenfalls wird das Signifikanzniveau im interhemisphärischen Seitenvergleich in keiner Untergruppe erreicht. Weiterhin ergeben sich keine statistisch signifikanten Differenzen bei der Gegenüberstellung der Gruppen LB und LV

### **3.2.4 Relative Rezeptordichten**

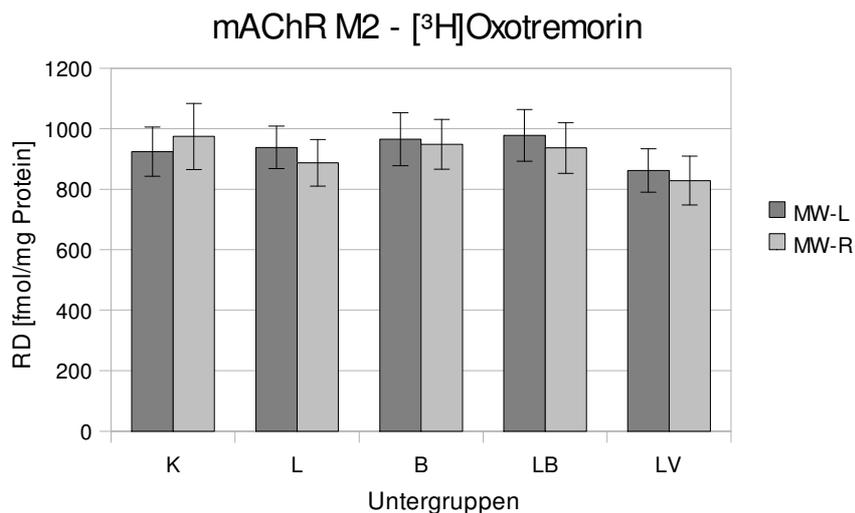
Diagramm 8 präsentiert die relativen RD im zeitlichen Verlauf über alle Untergruppen. In der Kontrollgruppe ist eine Verteilung der relativen RD in den Negativbereich zwischen -0,83 und -4,71 erkennbar. Dies zeigt eine in der Gruppe K bestehende dezente interhemisphärische Differenz der absoluten RD zwischen rechtem und linkem CPU. In der Gruppe L streuen die ermittelten Relativwerte überwiegend im negativen Wertebereich von -20,66 bis 5,93. Eine kontinuierliche Positivbewegung kann bei chronologischer Betrachtung ab der Gruppe L6W3M über L6W6M bis zur Gruppe L6W9M mit zunehmender Streuung in den positiven Wertebereich erkannt werden. Für die Gruppe B liegt die Verteilung der relativen RD zwischen -10,5 und 14,8. Auch hier ist eine Verschiebung der relativen RD im zeitlichen Verlauf überwiegend in den positiven Wertebereich ersichtlich. Für die Gruppe LB liegen die relativen RD in einem Streubereich von -13,07 bis 11,38, wobei von vierunddreißig Werten zwanzig Werte zwischen 0 und -10 verteilt sind. In der Gruppe LV liegt die Verteilung der relativen RD zwischen -13,67 und 5,2.



**Diagramm 8: Relative RD aller Untergruppen im zeitlichen Verlauf für den mACHR M<sub>1</sub> - [<sup>3</sup>H]Pirenzepin.** RD: hier relative Rezeptordichte; R: area-gewichtete RD rechtes CPu eines Tieres; L: area-gewichtete RD linkes CPu eines Tieres. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

### 3.3 mAChR M<sub>2</sub> - [<sup>3</sup>H]Oxotremorin

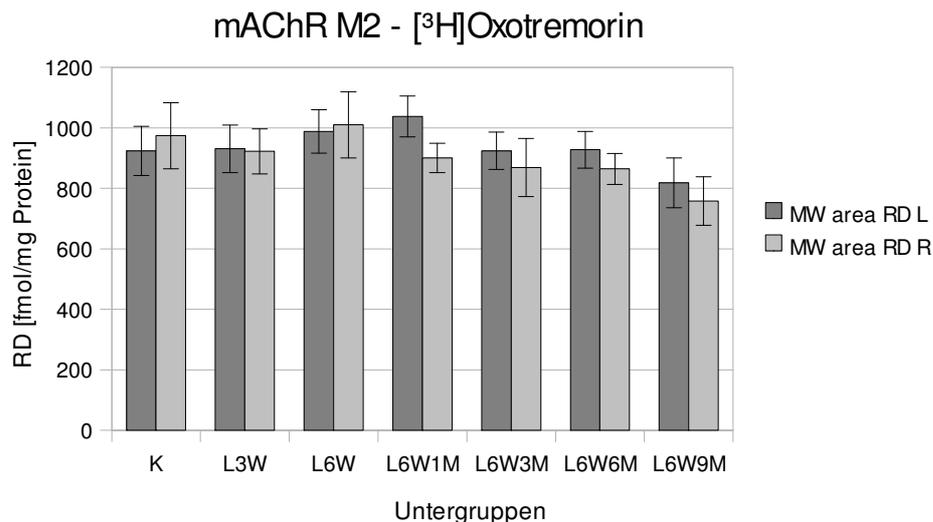
Diagramm 9 zeigt eine Zusammenfassung der area-gewichteten RD aller Untergruppen, welche als gemittelte RD der jeweiligen Gruppen K, L, B, LB und LV dargestellt sind. Hierbei ergeben sich für das jeweils linke CPU in den Gruppen L, B und LB eine Zunahme der RD im Vergleich zur ipsilateralen Kontrolle (K: 924,01 ± 81,56 [fmol/mg Protein] links; L: 938 ± 70,31 [fmol/mg Protein] links; B: 965,32 ± 88,06 [fmol/mg Protein] links; LB: 977,93 ± 85,24 [fmol/mg Protein] links). In der Gruppe LV hingegen zeigt sich eine Abnahme der RD (861,82 ± 71,67 [fmol/mg Protein] links). Für das rechte CPU ergibt sich im Abgleich mit der ipsilateralen Kontrolle stets eine Reduktion der RD (K: 974,36 ± 109,29 [fmol/mg Protein] rechts; L: 887,23 ± 76,68 [fmol/mg Protein] rechts; B: 948,33 ± 82,45 [fmol/mg Protein] rechts; LB: 936,45 ± 83,82 [fmol/mg Protein] rechts; LV: 828,13 ± 80,81 [fmol/mg Protein] rechts).



**Diagramm 9: Mittelwerte der area-gewichteten RD ± SD der Gruppen K, L, B, LB und LV.** MW-L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPU einer Gruppe; MW-R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPU einer Gruppe. Gruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

#### 3.3.1 Ergebnisse der Gruppe L

In Diagramm 10 sind die RD der Gruppe L mit den jeweiligen Untergruppen im zeitliche Verlauf dargestellt. Für das linke CPU ergibt sich im ipsilateralen Vergleich zur Kontrollgruppe (924 ± 82 [fmol/mg Protein] links) in den Untergruppen L3W, L6W, L6W1M und L6W6M eine Zunahme der RD über das Kontrollniveau hinaus (L3W: 931 ± 78 [fmol/mg Protein] links; L6W: 988 ± 71 [fmol/mg Protein] links; L6W1M: 1038 ± 68 [fmol/mg Protein] links).

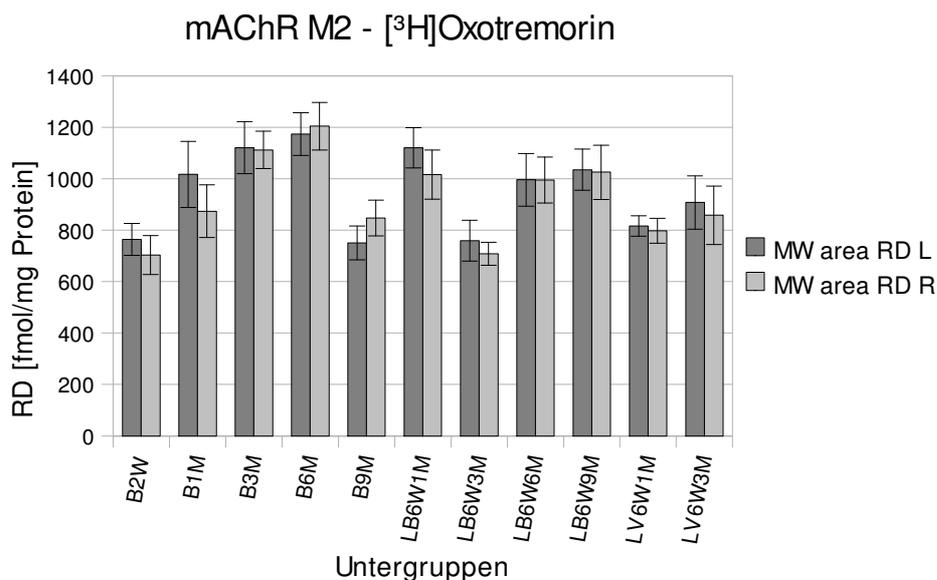


**Diagramm 10: Mittelwerte der area-gewichteten RD ± SD der Gruppe L im zeitlichen Verlauf. MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu; MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1**

links; L6W6M:  $928 \pm 61$  [fmol/mg Protein] links). Die RD der Untergruppe L6W9M ist ipsilateral zur Kontrolle vermindert (L6W9M:  $819 \pm 82$  [fmol/mg Protein] links). Für die Untergruppe L6W3M stimmt die RD ipsilateral mit der RD der Kontrolle überein (L6W3M:  $924 \pm 61$  [fmol/mg Protein] links). Das statistische Signifikanzniveau wird hierbei von keinem Untergruppenvergleich erreicht. Die Ergebnisse des rechten CPu zeigen im ipsilateralen Vergleich zur Kontrolle ( $974 \pm 109$  [fmol/mg Protein] rechts) eine Verminderung der RD in den Untergruppen L3W ( $922 \pm 75$  [fmol/mg Protein] rechts), L6W1M ( $900 \pm 49$  [fmol/mg Protein] rechts), L6W3M ( $869 \pm 96$  [fmol/mg Protein] rechts), L6W6M ( $864 \pm 51$  [fmol/mg Protein] rechts) und L6W9M ( $758 \pm 80$  [fmol/mg Protein] rechts). Lediglich in der Untergruppe L6W liegt die RD über dem ipsilateralen Kontrollniveau (L6W:  $1010 \pm 109$  [fmol/mg Protein] rechts). Eine statistisch signifikante Differenz der RD ergibt sich hierbei nur in der Untergruppe L6W9M im ipsilateralen Vergleich zur Gruppe K. Im interhemisphärischen Vergleich der RD innerhalb der jeweiligen Untergruppen ergeben keine signifikanten Differenzen.

### 3.3.2 Ergebnisse der Gruppen B, LB und LV

Die Ergebnisse der Gruppen B, LB und LV sind in Diagramm 11 dargestellt. In der Gruppe B zeigt sich in den Untergruppen B2W und B9M eine Reduktion der RD im Vergleich zur ipsilateralen Kontrolle (B2W:  $764 \pm 62$  [fmol/mg Protein] links;



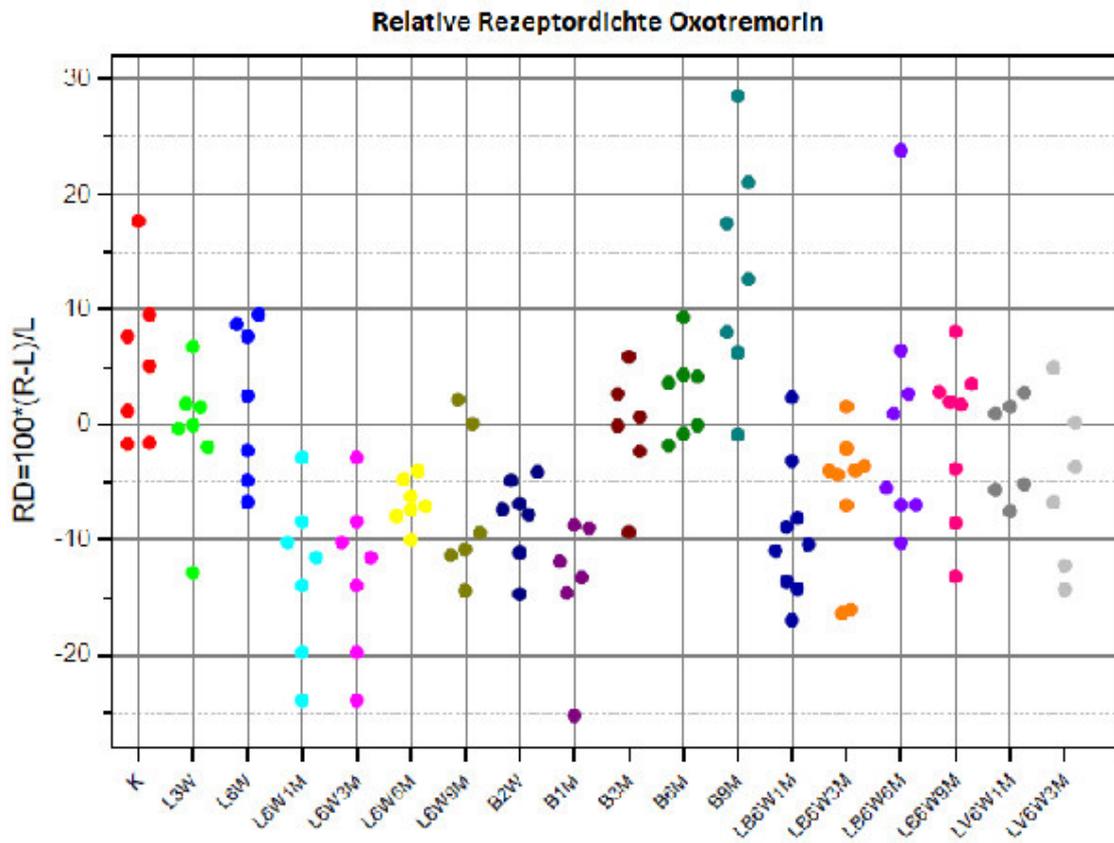
**Diagramm 11: Mittelwerte der area-gewichteten RD ± SD der Gruppen B, LB und LV im zeitlichen Verlauf.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu; MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

B9M:  $751 \pm 65$  [fmol/mg Protein] links). Die Messergebnisse der Untergruppen B1M, B3M und B6M liegen hingegen über dem ipsilateralen Kontrollniveau (B1M:  $1017 \pm 129$  [fmol/mg Protein] links; B3M:  $1121 \pm 101$  [fmol/mg Protein] links; B6M:  $1174 \pm 83$  [fmol/mg Protein] links). Eine signifikante Differenz zwischen den RD wird hier in den Untergruppen B3M und B6M erreicht, nicht jedoch in den Untergruppen B2W, B1M oder B9M. Im jeweils rechten CPu kann im Vergleich zur Gruppe K eine Reduktion der RD in den Untergruppen B2W ( $703 \pm 75$  [fmol/mg Protein] rechts), B1M ( $874 \pm 102$  [fmol/mg Protein] rechts) und B9M ( $847 \pm 69$  [fmol/mg Protein] rechts) gemessen werden. Eine Zunahme der RD im ipsilateralen Abgleich zeigt sich hingegen in den Untergruppen B3M ( $1112 \pm 73$  [fmol/mg Protein] rechts) und B6M ( $1205 \pm 93$  [fmol/mg Protein] rechts). Das Signifikanzniveau wurde hierbei in den Untergruppen B2W und B6M erreicht. Im interhemisphärischen Vergleich ergibt sich hingegen keine signifikante Veränderung der RD innerhalb jeweils einer Untergruppe. Die Ergebnisse der Gruppe LB zeigen für das linke CPu in den Untergruppen LB6W1M, LB6W6M und LB6W9M eine Zunahme der RD im ipsilateralen Vergleich zur Kontrollgruppe (LB6W1M:  $1121 \pm 78$  [fmol/mg Protein] links; LB6W6M:  $996 \pm 102$  [fmol/mg Protein] links; LB6W9M:  $1035 \pm 80$  [fmol/mg Protein] links). In der Untergruppe LB6W3M kann hingegen eine Reduktion der RD gemessen werden (LB6W3M:  $759 \pm 80$  [fmol/mg Protein] links). Statistische Signifikanz wurde allerdings nur in der Untergruppe LB6W1M, nicht jedoch in den restlichen Untergruppen erreicht. Für das rechte CPu zeigen die Ergebnisse im

ipsilateralen Abgleich mit der Kontrolle eine Zunahme der RD in den Untergruppen LB6W1M ( $1016 \pm 96$  [fmol/mg Protein] rechts), LB6W6M ( $995 \pm 90$  [fmol/mg Protein] rechts) und LB6W9M ( $1025 \pm 105$  [fmol/mg Protein] rechts). Nur die Untergruppe LB6W3M zeigt eine Verminderung der RD (LB6W3M:  $709 \pm 44$  [fmol/mg Protein] rechts), welche ebenfalls die einzig signifikante Differenz in diesem Vergleich ipsilateral zur Kontrolle darstellt. Im interhemisphärischen Vergleich innerhalb der Gruppe LB ergibt sich keine signifikante Veränderung der RD zwischen linkem und rechtem CPU innerhalb einer Untergruppe. Bei der Gegenüberstellung der Gruppen L und LB zeigt sich für das jeweils rechte CPU in den Untergruppen L6W9M und LB6W9M eine signifikante Differenz in den RD. In der Gruppe LV zeigt sich eine Verminderung der RD im linken CPU ipsilateral zur Gruppe K in den Untergruppen LV6W1M ( $816 \pm 40$  [fmol/mg Protein] links) und LV6W3M ( $908 \pm 103$  [fmol/mg Protein] links). Ebenfalls zeigen die Messergebnisse des rechten CPU im Kontrollabgleich eine Reduktion in beiden Untergruppen (LV6W1M:  $798 \pm 48$  [fmol/mg Protein] rechts und LV6W3M:  $858 \pm 114$  [fmol/mg Protein] rechts). Eine statistisch signifikante Differenzen der RD kann jedoch weder für das linke noch das rechte CPU erreicht werden. Auch im interhemisphärischen Vergleich innerhalb der einzelnen Untergruppen ergibt sich keine signifikante Veränderung der RD zwischen linke und rechtem CPU. Bei der Gegenüberstellung der Gruppen LB und LV zeigt sich hingegen für das rechte CPU eine signifikant niedrigere RD in der Untergruppe LV6W1M gemessen an LB6W1M.

### **3.3.3 Relative Rezeptordichten**

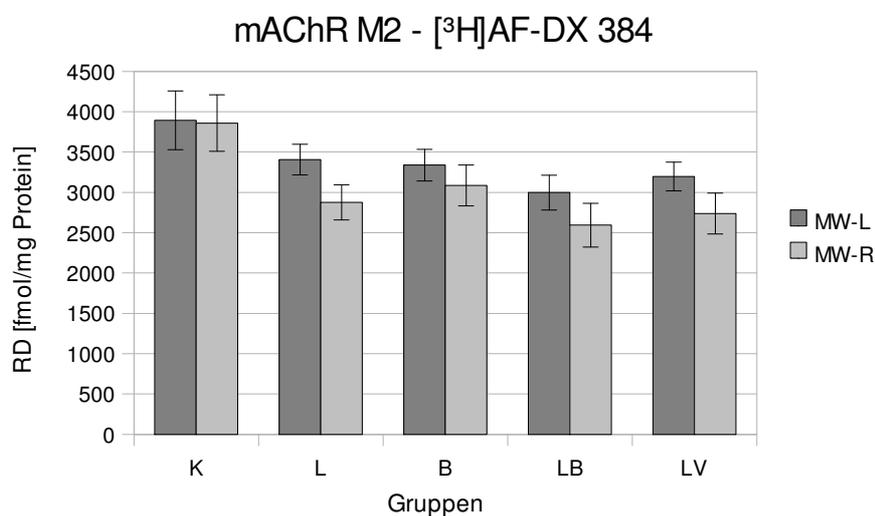
Diagramm 4 zeigt die Verteilung der relativen RD. Die Kontrollwerte streuen in einem Bereich von -1,7 bis 17,64, wobei 5 von 7 Relativwerten positiv sind. Dabei zeigen sich tendenziell größere absolute RD im rechten CPU. In der Gruppe L liegt der Streubereich von -23,95 bis 9,54. Ab der Untergruppe L6W1M verteilen sich die Relativwerte überwiegend im negativen Wertebereich, wobei fünfundzwanzig von siebenundzwanzig relativen RD kleiner 0 sind. In der Gruppe B erstreckt sich das Streuintervall von -25,26 bis 28,53. In den Untergruppen B2W und B1M sind alle Relativwerte kleiner 0. Ab der Untergruppe B3M ist eine zunehmende Verteilung in den positiven Wertebereich über 6 und 9 Monate erkennbar. Hierbei sind dreizehn von zwanzig Werten größer 0. Für die Gruppe LB verteilen sich die relativen RD zwischen -16,39 und 23,75, wobei elf von vierunddreißig Relativwerten größer 0 sind. In der Gruppe LV streuen die relativen RD von -14,34 bis 4,94.



**Diagramm 12: Relative RD aller Untergruppen im zeitlichen Verlauf für den mAChR M<sub>2</sub> - [³H]Oxotremorin.** RD: hier relative Rezeptordichte; R: area-gewichtete RD rechtes CPU eines Tieres; L: area-gewichtete RD linkes CPU eines Tieres. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

### 3.4 mAChR M<sub>2</sub> - [<sup>3</sup>H]AF-DX 384

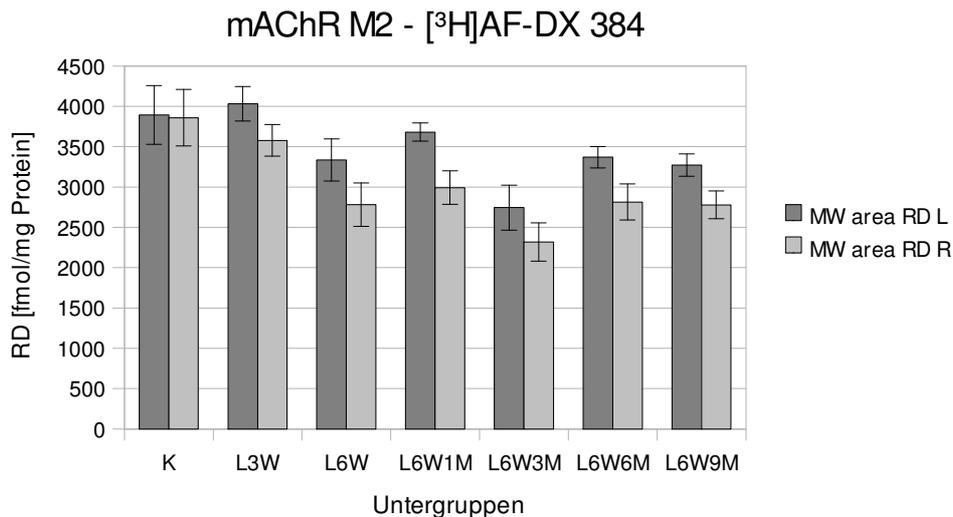
Aus Diagramm 13 wird ersichtlich, dass alle Versuchsgruppen (L: 3405,17 ± 189,86 [fmol/mg Protein] links und 2876,88 ± 217,53 [fmol/mg Protein] rechts; B: 3336,91 ± 196,89 [fmol/mg Protein] links und 3085,41 ± 253,94 [fmol/mg Protein] rechts; LB: 2997,41 ± 215,75 [fmol/mg Protein] links und 2595 ± 215,75 [fmol/mg Protein] rechts; LV: 3197,41 ± 179,08 [fmol/mg Protein] links und 2737,06 ± 253,61 [fmol/mg Protein] rechts) eine Reduktion der RD auf jeweils der linken und rechten Hirnhälfte im ipsilateralen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K: 3893,76 ± 362,7 [fmol/mg Protein] und 3859,26 ± 352,17 [fmol/mg Protein] rechts) aufweisen. Im gruppeninternen Vergleich ist die RD im rechten CPU hierbei stets kleiner als im CPU der linken Hemisphäre.



**Diagramm 13: Mittelwerte der area-gewichteten RD ± SD der Gruppen K, L, B, LB und LV.** MW-L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPU einer Gruppe; MW-R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPU einer Gruppe. Gruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

#### 3.4.1 Ergebnisse der Gruppe L

Diagramm 14 illustriert die erhobenen Daten. Die Ergebnisse des linken CPU zeigen eine Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K: 3894 ± 363 [fmol/mg Protein] links) in den Untergruppen L6W (3335 ± 262 [fmol/mg Protein] links), L6W1M (3680 ± 112 [fmol/mg Protein] links), L6W3M (2745 ± 280 [fmol/mg Protein] links), L6W6M (3369 ± 132 [fmol/mg Protein] links) und L6W9M (3271 ± 140 [fmol/mg Protein] links). In der Untergruppe L3W kann eine Zunahme der RD links auf 4031 ± 213 [fmol/mg Protein] gezeigt werden. Statistische Signifikanz wird im Vergleich zu den



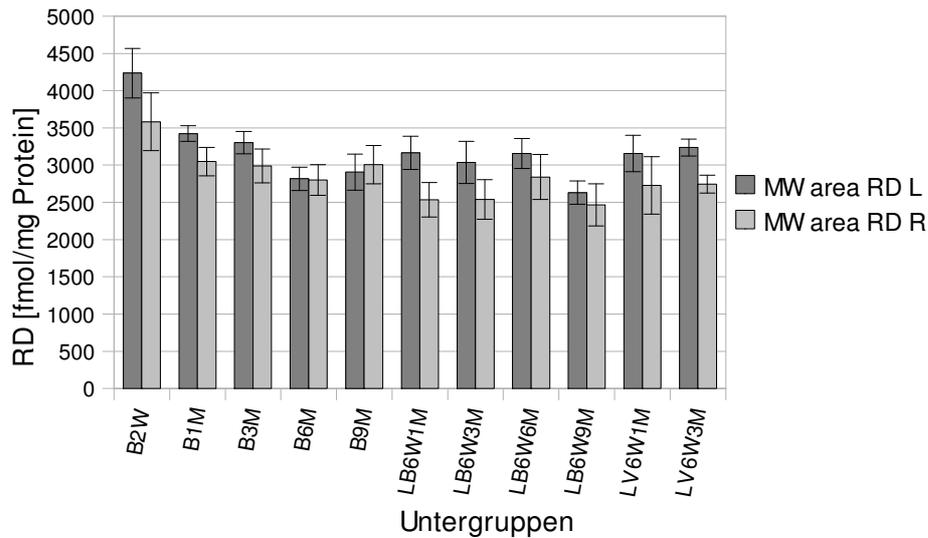
**Diagramm 14: Mittelwerte der area-gewichteten RD ± SD der Gruppe L im zeitlichen Verlauf.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPU; MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPU. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

Ergebnissen des linken CPU der Gruppe K in den Untergruppen L6W, L6W3M, L6W6M und L6W9M, nicht jedoch in den Untergruppen L3W und L6W1M erreicht. Die Ergebnisse des rechten CPU zeigen eine Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K: 3859 ± 352 [fmol/mg Protein] rechts) in allen Untergruppen (L3W: 3579 ± 195 [fmol/mg Protein] rechts, L6W: 2782 ± 269 [fmol/mg Protein] rechts, L6W1M: 2991 ± 208 [fmol/mg Protein] rechts, L6W3M: 2317 ± 237 [fmol/mg Protein] rechts, L6W6M: 2814 ± 225 [fmol/mg Protein] rechts und L6W9M: 2778 ± 171 [fmol/mg Protein] rechts). Statistische Signifikanz wird im Vergleich zu den Ergebnissen des rechten CPU der Gruppe K in den Untergruppen L6W, L6W1M, L6W3M, L6W6M und L6W9M, nicht jedoch in der Untergruppe L3W erreicht. Im Seitenvergleich der einzelnen Untergruppen ergeben sich signifikante interhemisphärische Differenzen der RD in den Untergruppen L6W, L6W1M und L6W6M, nicht jedoch in den Untergruppen L3W, L6W3M und L6W9M.

### 3.4.2 Ergebnisse der Gruppen B, LB und LV

Diagramm 15 präsentiert die mittleren gewichteten RD der Gruppen B, LB und LV. In der Gruppe B zeigen die Ergebnisse des linken CPU ein Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in den Untergruppen B1M (3423 ± 149 [fmol/mg Protein] links), B3M (3304 ± 105 [fmol/mg Protein] links), B6M (2816 ± 157 [fmol/mg Protein] links), und B9M (2906 ± 242 [fmol/mg Protein] links). Die Untergruppe B2W zeigt

### mAChR M2 - [<sup>3</sup>H]AF-DX 384



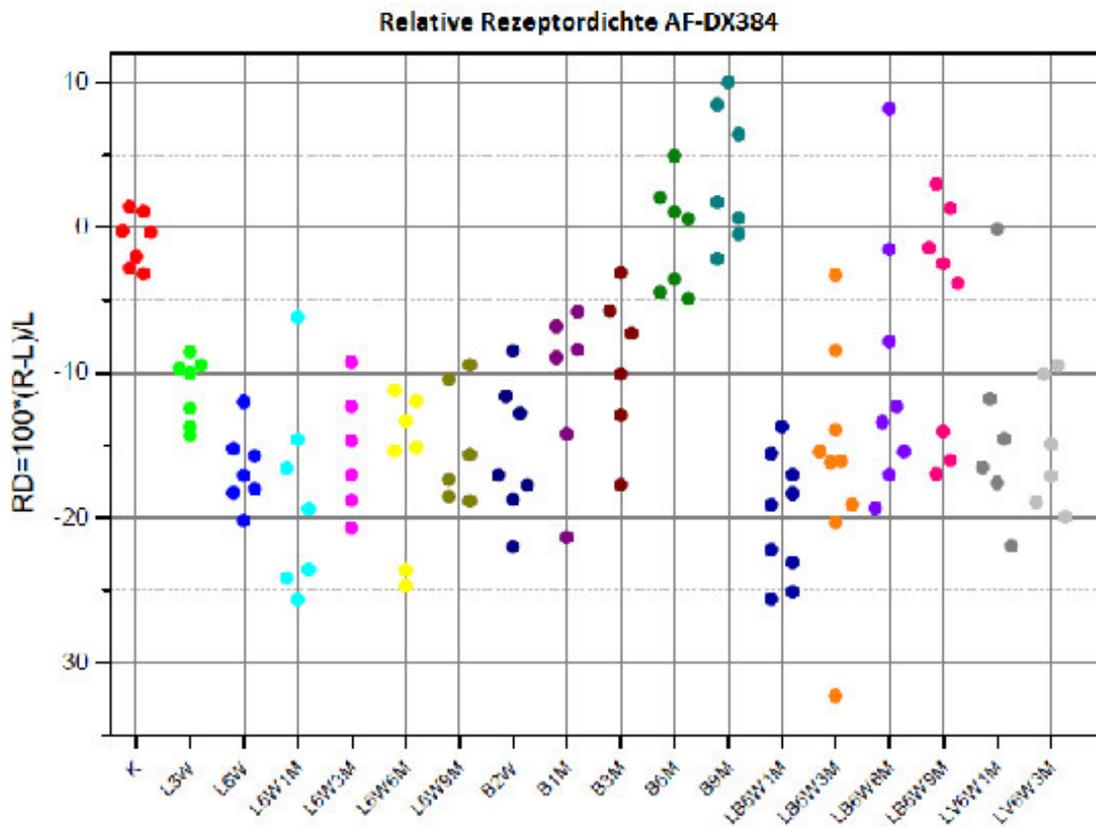
**Diagramm 15: Mittelwerte der area-gewichteten RD ± SD der Gruppen B, LB und LV im zeitlichen Verlauf.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu; MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

eine Zunahme der RD links auf  $4235 \pm 332$  [fmol/mg Protein]. Statistische Signifikanz wird im Vergleich zu den Ergebnissen des linken CPu der Gruppe K in den Untergruppen B3M, B6M und B9M, nicht jedoch in den Untergruppen B2W und B1M. Die Ergebnisse des rechten CPu zeigen eine Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur Gruppe K in allen Untergruppen (B2W:  $3582 \pm 387$  [fmol/mg Protein] rechts, B1M:  $3047 \pm 192$  [fmol/mg Protein] rechts, B3M:  $2990 \pm 227$  [fmol/mg Protein] rechts, B6M:  $2800 \pm 207$  [fmol/mg Protein] rechts, B9M:  $3006 \pm 256$  [fmol/mg Protein] rechts). Statistische Signifikanz wird im Vergleich zu den Ergebnissen des rechten CPu der Gruppe K in den Untergruppen B1M, B3M, B6M und B9M erreicht. Im Seitenvergleich der einzelnen Untergruppen ergeben sich signifikante interhemisphärische Differenzen der RD in der Untergruppe B2W, nicht jedoch in den Untergruppen B1M, B3M, B6M und B9M. In der Gruppe LB zeigen die Ergebnisse des linken CPu ein Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in den Untergruppen LB6W1M ( $3165 \pm 222$  [fmol/mg Protein] links), LB6W3M ( $3037 \pm 284$  [fmol/mg Protein] links), LB6W6M ( $3156 \pm 202$  [fmol/mg Protein] links) und LB6W9M ( $2631 \pm 155$  [fmol/mg Protein] rechts). Statistische Signifikanz wird im Vergleich zu den Ergebnissen des linken CPu der Gruppe K hierbei in allen Untergruppen erreicht. Die Ergebnisse des rechten CPu zeigen eine Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur Gruppe K in den Untergruppen LB6W1M ( $2533 \pm 231$  [fmol/mg Protein] rechts), LB6W3M ( $2539 \pm 267$  [fmol/mg Protein] rechts), LB6W6M ( $2842 \pm 302$  [fmol/mg Protein] rechts) und

LB6W9M ( $2466 \pm 285$  [fmol/mg Protein] rechts). Statistische Signifikanz wird im Vergleich zu den Ergebnissen des rechten CPu der Gruppe K hierbei in allen Untergruppen erreicht. Im Seitenvergleich der einzelnen Untergruppen ergeben sich signifikante interhemisphärische Differenzen der RD in der Untergruppe LB6W1M, nicht jedoch in den Untergruppen LB6W3M, LB6W6M und LB6W9M. Bei der Gegenüberstellung der Gruppen L und LB ergeben sich keine signifikanten Differenzen der RD zwischen jeweils dem rechten CPu der Untergruppen. In der Gruppe LV zeigen die Ergebnisse des linken CPu eine Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in den Untergruppen LV6W1M ( $3158 \pm 244$  [fmol/mg Protein] links) und LV6W3M ( $3237 \pm 114$  [fmol/mg Protein] links). Statistische Signifikanz wird im Vergleich zu den Ergebnissen des linken CPu der Gruppe K hierbei in beiden Untergruppen erreicht. Die Ergebnisse des rechten CPu zeigen eine Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur Gruppe K ebenfalls in beiden Untergruppen LV6W1M ( $2728 \pm 386$  [fmol/mg Protein] rechts) und LV6W3M ( $2746 \pm 121$  [fmol/mg Protein] rechts). Statistische Signifikanz wird auch hier im Vergleich zu den Ergebnissen des rechten CPu der Gruppe K in beiden Untergruppen erreicht. Im Seitenvergleich innerhalb der beiden Untergruppen ergeben sich jedoch keine signifikanten interhemisphärischen Differenzen der RD. Im Vergleich der Gruppen LB und LV zeigen sich zwischen jeweils dem rechten CPu keine signifikanten Dichtedifferenzen.

### **3.4.3 Relative Rezeptordichten**

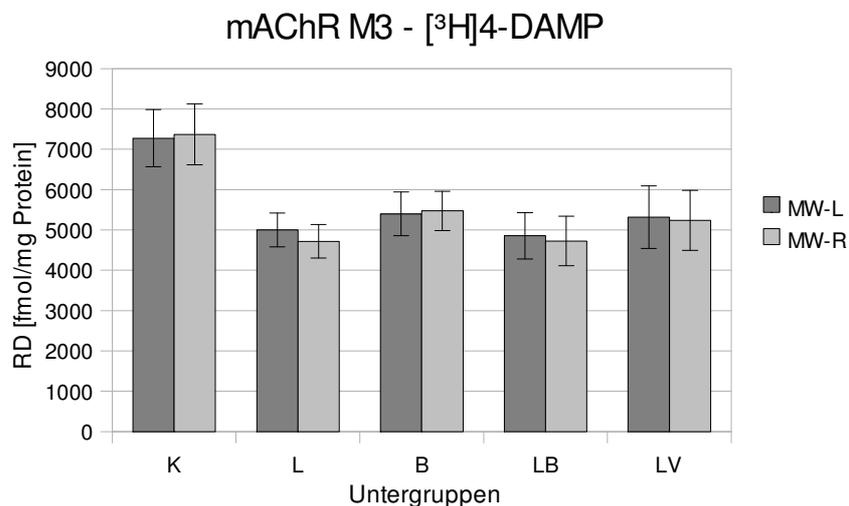
Diagramm 16 zeigt die relativen RD der einzelnen Untergruppen im zeitlichen Verlauf. Die Verteilung der Punktwerte in der Gruppe K erstreckt sich von -3,19 bis 1,44 um den Nullwert. Für die Gruppe L zeigt sich, dass alle relativen RD im negativen Wertebereich liegen. Die Relativwerte streuen von -25,68 bis -6,17. Eine Trendbewegung im zeitlichen Verlauf ist nicht ableitbar. Die relativen RD sind konstant negativ. In der Gruppe B erstreckt sich das Streuintervall von -21,35 bis 10,01. Hierbei ist ab der Untergruppe B1M eine deutliche Positivbewegung im zeitlichen Verlauf erkennbar. Für die Gruppe LB wurde ein Streubereich von -25,62 bis 8,2 ermittelt. Erkennbar ist im Vergleich zur Gruppe L eine zunehmende Verschiebung der Relativwerte in den positiven Wertebereich. Für die Gruppe LV liegt eine konstante Verteilung der Punktwerte im Negativbereich von -21,97 bis -0,08 vor.



**Diagramm 16: Relative RD aller Untergruppen im zeitlichen Verlauf für den mAChR M<sub>2</sub> - [<sup>3</sup>H]AF-DX 384.** RD: hier relative Rezeptordichte; R: area-gewichtete Rezeptordichte rechtes CPU eines Tieres; L: area-gewichtete Rezeptordichte linkes CPU eines Tieres. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

### 3.5 mAChR M<sub>3</sub> - [<sup>3</sup>H]4-DAMP

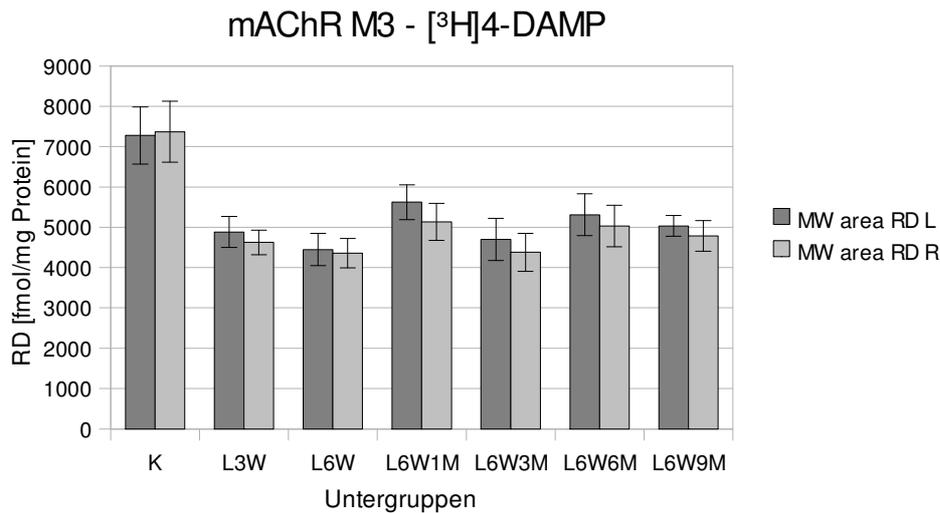
Für einen allgemeinen Überblick sind die Mittelwerte der area-gewichteten RD aller Untergruppen zusammengefasst und als mittlere RD der Gruppen K, L, B, LB und LV in Diagramm 17 dargestellt. Hieraus wird ersichtlich, dass alle Gruppen (L: 4998,5 ± 418,75 [fmol/mg Protein] links und 4716,92 ± 416,66 [fmol/mg Protein] rechts, B: 5398,39 ± 540,73 [fmol/mg Protein] links und 5473 ± 486,08 [fmol/mg Protein] rechts, LB: 4853,04 ± 572,15 [fmol/mg Protein] links und 4724,85 ± 612,63 [fmol/mg Protein] rechts, LV: 5316,14 ± 772,99 [fmol/mg Protein] links und 5239,27 ± 744,5 [fmol/mg Protein] rechts) eine Reduktion der RD auf jeweils der linken und rechten Hirnhälfte im ipsilateralen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K: 7274,2 ± 708,9 [fmol/mg Protein] links und 7368,03 ± 757,47 [fmol/mg Protein] rechts) aufweisen.



**Diagramm 17: Mittelwerte der area-gewichteten RD ± SD der Gruppen K, L, B, LB und LV.** MW-L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPU einer Gruppe; MW-R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPU einer Gruppe. Gruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

#### 3.5.2 Ergebnisse der Gruppe L

Es kann gezeigt werden, dass eine unilaterale Läsionierung des rechten MFB der Versuchstiere aus der Gruppe L stets eine Reduktion der RD in sowohl dem rechten als auch dem linken CPU verursacht. Diagramm 18 präsentiert die RD der Gruppe L im zeitlichen Verlauf. Die Ergebnisse des linken CPU zeigen eine Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur Gruppe K (7274 ± 709 [fmol/mg Protein] links) in allen Untergruppen (L3W: 4882 ± 385 [fmol/mg Protein] links, L6W: 4447 ± 401 [fmol/mg Protein] links, L6W1M:

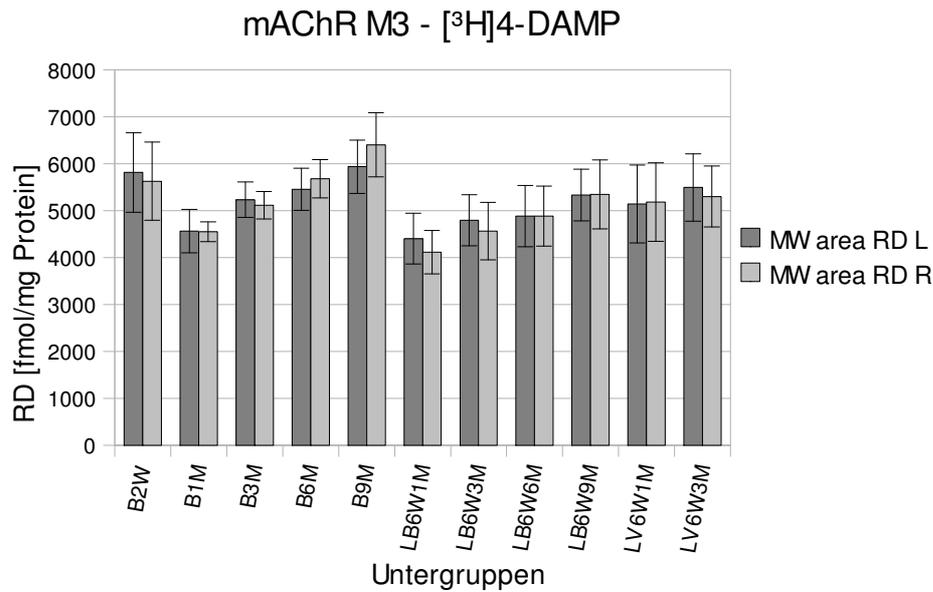


**Diagramm 18: Mittelwerte der area-gewichteten RD ± SD der Gruppe L im zeitlichen Verlauf.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu; MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

5621 ± 433 [fmol/mg Protein] links, L6W3M: 4697 ± 519 [fmol/mg Protein] links, L6W6M: 5311 ± 516 [fmol/mg Protein] links, L6W9M: 5032 ± 259 [fmol/mg Protein] links). Statistische Signifikanz wird hierbei im ipsilateralen Vergleich zur Kontrolle in allen Fällen erreicht. Die Ergebnisse des rechten CPu zeigen ebenfalls eine Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur Gruppe K (7368 ± 757 [fmol/mg Protein] rechts) in allen Untergruppen (L3W: 4623 ± 305 [fmol/mg Protein] rechts, L6W: 4357 ± 366 [fmol/mg Protein] rechts, L6W1M: 5133 ± 463 [fmol/mg Protein] rechts, L6W3M: 4378 ± 472 [fmol/mg Protein] rechts, L6W6M: 5027 ± 515 [fmol/mg Protein] rechts, L6W9M: 4784 ± 379 [fmol/mg Protein] rechts). Statistische Signifikanz wird hierbei im ipsilateralen Vergleich zur Kontrolle in allen Fällen erreicht. Im Seitenvergleich der einzelnen Untergruppen ergeben sich keine signifikanten interhemisphärischen Differenzen der RD.

### 3.5.3 Ergebnisse der Gruppen B, LB und LV

Diagramm 19 präsentiert die Ergebnisse der Gruppen B, LB und LV im zeitlichen Verlauf. In der Gruppe B zeigen die Ergebnisse des linken CPu eine Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in allen Untergruppen (B2W: 5811 ± 845 [fmol/mg Protein] links, B1M: 4562 ± 461 [fmol/mg Protein] links, B3M: 5231 ± 379 [fmol/mg Protein] links, B6M: 5453 ± 450 [fmol/mg Protein] links, B9M: 5935 ± 569 [fmol/mg Protein] links). Statistische Signifikanz wurde hierbei im Vergleich zur Kontrollgruppe stets erreicht. Die Ergebnisse des rechten CPu zeigen ebenfalls eine Verminderung der RD im



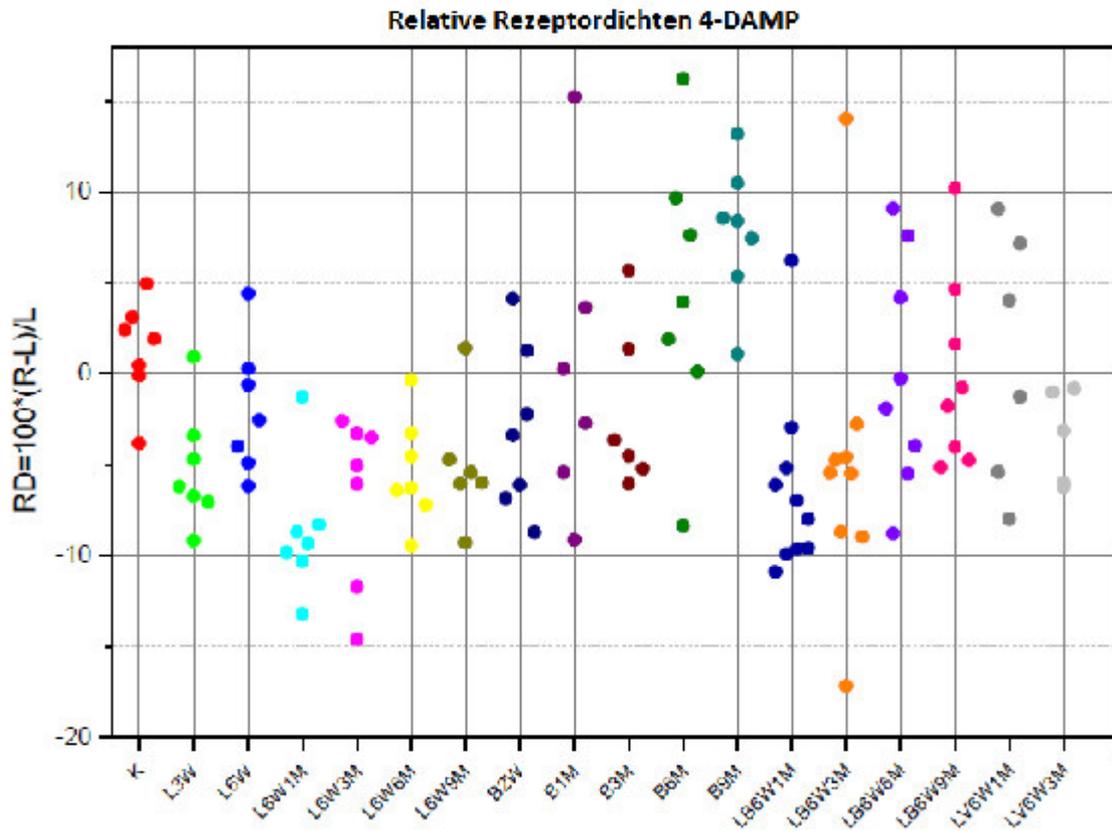
**Diagramm 19: Mittelwerte der area-gewichteten RD ± SD der Gruppen B, LB und LV im zeitlichen Verlauf.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPU; MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPU. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

ipsilateralen Vergleich zur Gruppe K in allen Untergruppen (B2W: 5625 ± 831 [fmol/mg Protein] rechts, B1M: 4548 ± 212 [fmol/mg Protein] rechts, B3M: 5114 ± 292 [fmol/mg Protein] rechts, B9M: 6401 ± 685 [fmol/mg Protein] rechts). Statistische Signifikanz wurde hierbei in den Untergruppen B2W, B1M, B3M und B6M, nicht jedoch in der Untergruppe B9M erreicht. Im Seitenvergleich der einzelnen Untergruppen ergeben sich keine signifikanten interhemisphärischen Differenzen der RD. In der Gruppe LB zeigen die Ergebnisse des linken CPU eine Verminderung der RD im ipsilateralen Vergleich zur Kontrolle in allen Untergruppen (LB6W1M: 4401 ± 541 [fmol/mg Protein] links, LB6W3M: 4795 ± 542 [fmol/mg Protein] links, LB6W6M: 4884 ± 653 [fmol/mg Protein] links, LB6W9M: 5332 ± 552 [fmol/mg Protein] links). Statistische Signifikanz wird hierbei im Vergleich zur Kontrolle in allen Untergruppen erreicht. Die Ergebnisse des rechten CPU im zeigen ebenfalls eine Verminderung der RD im Vergleich zu Gruppe K in allen Untergruppen (LB6W1M: 4113 ± 462 [fmol/mg Protein] rechts, LB6W3M: 4560 ± 612 [fmol/mg Protein] rechts, LB6W6M: 4880 ± 641 [fmol/mg Protein] rechts, LB6W9M: 5346 ± 735 [fmol/mg Protein] rechts). Statistische Signifikanz wird auch hierbei im Vergleich zur Kontrollgruppe stets erreicht. Im Seitenvergleich der einzelnen Untergruppen ergeben sich keine signifikanten interhemisphärischen Differenzen der RD. Bei der Gegenüberstellung der Gruppen L und LB ergeben sich bei der zeitlichen Paarung der Untergruppen keine statistisch signifikanten Differenzen der RD. In der Gruppe LV zeigen die Ergebnisse des linken CPU im ipsilateralen

Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ebenfalls eine Verminderung der RD in beiden Untergruppen (LV6W1M:  $5140 \pm 830$  [fmol/mg Protein] links, LV6W3M:  $5492 \pm 716$  [fmol/mg Protein] links). Statistische Signifikanz hierbei im Vergleich zur Kontrollgruppe stets erreicht. Die Ergebnisse des rechten CPu zeigen auch hier im ipsilateralen Vergleich zur Gruppe K eine statistisch signifikante Verminderung der RD in beiden Untergruppen (LV6W1M:  $5181 \pm 838$  [fmol/mg Protein] rechts, LV6W3M:  $5298 \pm 651$  [fmol/mg Protein] rechts). Im Abgleich der Gruppen LB und LV ergeben sich für die zeitliche Paarung der Untergruppen keine signifikanten Differenzen in den RD.

#### **3.5.4 Relative Rezeptordichten**

Diagramm 20 zeigt die Verteilung relativen RD. Die Punktwerte der Kontrolltiere streuen in einem Bereich von -3,82 bis 4,97. Für die Gruppe L wurde ein Streubereich von -14,63 bis 4,42 ermittelt. Dabei sind achtunddreißig von einundvierzig Punktwerten im negativen Wertebereich verteilt. In der Gruppe B liegen die relativen RD zwischen -9,13 und 16,25 verteilt. Ab der Untergruppe B3M ist eine über den zeitlichen Verlauf zunehmende Positivbewegung erkennbar. Für die Gruppe LB wurde ein Streubereich von -17,17 bis 14,04 ermittelt. Im Vergleich zur Gruppe L ist ab der Untergruppe LB6W6M eine zunehmende Verteilung in den positiven Wertebereich ersichtlich. Die relativen RD der Gruppe LV verteilen sich zwischen -8 und 9,08.



**Diagramm 20: Relative RD aller Untergruppen im zeitlichen Verlauf für den mAChR  $M_3$  - [ $^3H$ ]4-DAMP.**  
 RD: hier relative Rezeptordichte; L: area-gewichtete Rezeptordichte linkes CPU eines Tieres; R: area-gewichtete Rezeptordichte rechtes CPU eines Tieres. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

## 4. Diskussion

### 4.1 Rezeptordichteverteilung im CPU

Vergleicht man die im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit gemessenen RD mit den bisherigen Angaben aus der Literatur, so können Gemeinsamkeiten, aber auch Abweichungen von den publizierten Daten beobachtet werden. Tabelle 4 gibt hierzu einen Überblick, indem die RD des linken und rechten CPU unserer unbehandelten Kontrollgruppe gemittelt und den Kontrolltieren aus diversen autoradiographischen Rezeptorbindungsstudien gegenübergestellt werden. Dabei fällt eine z.T. große Inhomogenität in den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen auf. Für die nAChR konnten von uns RD in ähnlicher Größenordnung gemessen werden, wie sie bereits für den Liganden [<sup>3</sup>H]Epibatidin beschrieben sind (Bauer et al., 2005). Andere Arbeitsgruppen hingegen veröffentlichten Ergebnisse, welche über 60% niedriger als die von uns gemessenen sind (Haghir et al., 2009; Zoli et al., 2002). Für den M<sub>1</sub>-selektiven Liganden [<sup>3</sup>H]Pirenzepin konnten striatale RD ermittelt werden, die sich zum einen an bereits ermittelte Daten annähern (Bauer et al., 2005), aber zum anderen ein Vielfaches der Dichtewerte anderer Arbeitsgruppen darstellen (Muccioli et al., 1996; Cortes und Palacios, 1986; Haghir et al., 2009; Araujo et al., 1991). Hierbei ist die von uns bestimmte mittlere RD mit 5097 [fmol/mg Protein] die höchste bisher beschriebene. Auch für den M<sub>2</sub>-selektiven Liganden [<sup>3</sup>H]Oxotremorin und den M<sub>3</sub>-Antagonisten [<sup>3</sup>H]4-DAMP liegen die publizierten RD deutlich niedriger als in unserer Versuchsreihe ([<sup>3</sup>H]Oxotremorin: K: 949 [fmol/mg Protein] vs. 94-305 [fmol/mg Protein] Haghir et al., 2009; Cortes und Palacios, 1986; Palomero-Gallagher et al., 2008 und 4-DAMP: K (Seiten gemittelt): 7321 [fmol/mg Protein] vs. 216 [fmol/mg Protein] Haghir et al., 2009 und vs. 1042-1066 [fmol/mg Protein] Palomero-Gallagher et al., 2008). Für den Liganden [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 hingegen findet sich in der Literatur eine ähnliche Rezeptordichte (vgl. 3877 [fmol/mg Protein] vs. 4105 [fmol/mg Protein] Bauer et al., 2005). Diese uneinheitlichen Literaturangaben sind möglicherweise auf unterschiedliche Ansätze in Versuchsplanung und -durchführung in den einzelnen Arbeitsgruppen zurück zu führen. Beispielsweise wurden unterschiedliche Versuchstiere, u.a. Wistar-Ratten (Haghir et al., 2009; Cortes und Palacios, 1986), Sprague-Dawley-Ratten (Bauer et al., 2005; Zoli et al., 2002; Muccioli et al., 1996), Lewis-Ratten (Palomero-Gallagher et al., 2008) und Long-Evans-Ratten (Araujo et al., 1990) verwendet. Für die vorliegende Rezeptorbindungsstudie kamen männliche Wistarratten zum Einsatz. Auch ist das Vorgehen bei der Aufbewahrung der Rattenhirne initial nach Entnahme und die anschließende

**Tabelle 4: Autoradiographisch bestimmte RD aus der publizierten Literatur und eigene Ergebnisse im Überblick.** Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis. Gruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

<b>Rezeptor – [<sup>3</sup>H]Ligand</b>	<b>RD CPu Gruppe K (gemittelt) in [fmol/mg Protein]</b>	<b>RD CPu Kontrollen gem. Literaturangaben in [fmol/mg Protein]</b>
<b>nAChR – [<sup>3</sup>H]Epibatidin</b>	387	125 (Haghir et al., 2009) 457 (Bauer et al., 2005) 183 (Zoli et al., 2002)
<b>M<sub>1</sub> – [<sup>3</sup>H]Pirenzepin</b>	5097	4121 (Bauer et al., 2005) 1498 – 2241 (Muccioli et al., 1996) 1371 (Cortes und Palacios, 1986) 506 (Haghir et al., 2009) 746 – 882 (Araujo et al., 1990) 423-432 (Palomero-Gallagher et al., 2008)
<b>M<sub>2</sub> – [<sup>3</sup>H]Oxotremorin (Agonist)</b>	949	166 (Haghir et al., 2009) 305 (Cortes und Palacios, 1986) 93-94 (Palomero-Gallagher et al., 2008)
<b>M<sub>2</sub> – [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 (Antagonist)</b>	3877	4105 (Bauer et al., 2005)
<b>M<sub>3</sub> – [<sup>3</sup>H]4-DAMP</b>	7321	216 (Haghir et al., 2009) 1042-1066 (Palomero-Gallagher et al., 2008)

Konservierung in den Arbeitsgruppen unterschiedlich. Bauer et al., (2005) nutzten -50°C kaltes 2-Methylbutan zur initialen Kühlung der Hirne und konservierten die Hirnschnitte nach Anfertigung im Kryostat bei -80°C bis zur Verwendung. Die Arbeitsgruppen um Haghir et al., (2005) und Palomero-Gallagher et al., (2008) gingen ähnlich bei der Gewebeaufbereitung vor, indem sie -50 °C bzw. -40 °C kaltes Isopentan zur Konservierung nutzten und die Hirne anschließend jeweils bei -70 °C lagerten. Cortes und Palacios, (1986) nutzen zur Kühlung und Konservierung flüssigen Stickstoff. Muccioli et al., (1996) lagerten die Hirne bei weitaus höheren Temperaturen von -25 °C, wobei die Verwendung eines bestimmten Konservierungsmittels nicht angegeben wurde. Zoli et al., (2002) froren die Hirne bei -70 °C ein, ebenfalls ohne Angabe eines Konservierungsträgers. In unserer Arbeitsgruppe wurde ähnlich oben beschrieben -80 °C kaltes Isopentan zur initialen Kühlung der Hirne verwendet und die Hirnschnitte bei -80 °C bis zur Autoradiographie gelagert. Weiterhin sind Übereinstimmung aber auch Unterschiede in der Messung der RD beschrieben: Bauer et al., (2005), Haghir et al., (2009) und Palomero-Gallagher et al., (2008) beschreiben untereinander und im Vergleich zur vorliegenden Arbeit eine relativ ähnliche Vorgehensweisen bei der in-

in vitro Rezeptorautoradiographie durch Nutzung des gleichen Ablaufs von Präinkubation, Inkubation und abschließender Waschung der Hirnschnitte mit Verwendung ähnlich konzentrierten Liganden und Kompetitoren zur Bestimmung von totaler, unspezifischer und spezifischer Bindung. Hingegen basieren die berechneten Rezeptordichten von Zoli et al., (2002), Cortes und Palacios, (1986), Araujo et al., (1990) und Muccioli et al., (1996) auf Aktivitätsmessungen mittels Flüssigkeits-Szintillations-Zählers. Demnach weicht die Aufbereitung der Gewebeproben z.T. stark von dem üblichen Vorgehen bei der in-vitro Rezeptorautoradiographie ab. Cortes und Palacios, (1986) beschreiben daneben eine etwas andere Versuchsplanung: Die Autoren untersuchten die Fähigkeit verschiedener mAChR-Agonisten und -Antagonisten in aufsteigender Konzentration N-Methyl-Scopolamin aus der Rezeptorbindung zu verdrängen und bestimmten damit die Dichte der einzelnen Rezeptorbindungsstellen für die jeweiligen Liganden.

#### **4.2 Rezeptordichteverteilung nach unilateraler 6-OHDA-Injektion**

Die Auswirkungen einer unilateralen intrazerebralen Injektion des neurotoxischen 6-OHDA auf die Zellen des ZNS und damit verbundenen Alterationen in den RD der auf den entsprechenden Nervenzellen lokalisierten nAChR werden in der Literatur unlängst beschrieben: Clark und Pert, (1985) konnten mit einer einseitigen Injektion von 9 µg 6-OHDA in das MFB von männlichen Wistarratten autoradiographisch eine Reduktion der Bindung tritiummarkierten Nikotins, u.a. im ipsilateralen Striatum von 25% bis 33% nachweisen. Schwartz et al., (1984) zeigen mit einer unilateralen intraventrikulären Injektion von 250 µg 6-OHDA ebenfalls mittels Rezeptorautoradiographie eine signifikante Abnahme der striatalen Bindung von [<sup>3</sup>H]Acetylcholin von ca. 29% ipsilateral zur Injektionsseite. Perez et al., (2010) beobachten unter Verwendung des nAChR-selektiven Liganden Epibatidin mit einer unilateralen Injektion von 4 bis 12 µg 6-OHDA in das MFB eine Reduktion der spezifischen [<sup>123</sup>I]Epibatidin-Bindung um bis zu 47% im ipsilateralen Striatum. Ebenfalls nutzten Zoli et al., (2002) in ihren autoradiographischen Untersuchungen [<sup>3</sup>H]Epibatidin als Liganden zum Nachweis von Veränderungen in der RD: Nach stereotaktischer Injektion von 10 µg 6-OHDA in das MFB männlicher Ratten kann eine Reduktion der striatalen [<sup>3</sup>H]Epibatidin-Bindung mit nachfolgend bestimmter Verminderung der RD um fast 50% ( $99 \pm 6$  [fmol/mg Protein]) im Vergleich zur Kontrolle ( $183 \pm 10$  [fmol/mg Protein]) gemessen werden. Alle o.g. Autoren untersuchen die Rattenhirne zwischen 7 Tagen und 5 Wochen nach 6-OHDA-Applikation. Die vorliegende Arbeit untersucht darüber hinaus die Auswirkungen des Läsionseffektes über

einen Zeitraum von mehr als 9 Monaten. Bei den mit [<sup>3</sup>H]Epibatidin-markierten nAChR in jeder betrachteten Zeitgruppe eine Reduktion der RD im CPU ipsilateral zur Läsionsseite von mehr als 60% (62,2% bis 69,4%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Die konstanten Ergebnisse über einen derart langen Beobachtungszeitraum legen daher eine dauerhafte und irreversible Reduktion der nAChR im Striatum nahe. Wie schon z.T. durch o.g. Arbeitsgruppen vermutet, ist dies wahrscheinlich auf die zumindest teilweise Lokalisation nAChR auf Axonterminalen dopaminerger nigrostriataler Afferenzen zurückzuführen, welche im Rahmen einer Injektion von 6-OHDA ipsilateral zu Grunde gehen. Entsprechende Evidenz für deren striatale subzelluläre Lokalisation stützt diese Vermutung weiter (Jones et al., 2001; Zoli et al., 2002; Zhou et al., 2002). Dass im Striatum nach der Läsionierung nigrostriataler Fasern noch autoradiographisch RD gemessen werden konnten, kann in Anlehnung an Rezeptorstudien auf eine Verteilung nAChR auf verschiedene Afferenzen und Neuronenpopulationen im Striatum der Ratte zurückgeführt werden (Garcia-Munoz et al., 1996; Sandor et al., 1991; Rover et al., 2002; Koos und Tepper, 2002; McClure-Begle et al., 2009). Da ausschließlich ipsilateral zur Läsion signifikante Reduktionen in den absoluten RD gemessen wurden, ist ein auf die kontralaterale Hemisphäre übergreifender Effekt des 6-OHDA unwahrscheinlich.

Auch für mAChR sind in der Literatur Veränderungen der RD nach unilateraler stereotaktischer 6-OHDA-Applikation beschrieben: Araki et al., (2000) konnten nach unilateraler Injektion von 10 µg 6-OHDA in das MFB männlicher Wistarratten eine Reduktion der ipsilateralen striatalen [<sup>3</sup>H]QNB-Bindung, als unspezifischen Marker für mAChR, von 12-17% in einem Zeitraum von 8 Wochen nach Läsionierung beobachten. Konträr dazu berichten die Autoren im kontralateralen Striatum über eine signifikante Zunahme der [<sup>3</sup>H]QNB-Bindung, mit einem über 8 Wochen ansteigenden Trend. Cross und Waddington, (1979) berichteten nach ähnlicher Vorgehensweise über eine Reduktion der [<sup>3</sup>H]QNB-Bindung von ca. 30% in der ipsilateralen SN. Offensichtlich affektiert eine direkte Applikation von 6-OHDA in das Rattenhirn also die mAChR in verschiedenen Hirnarealen. Um die oben beschriebenen Veränderungen der RD den einzelnen Subtypen mAChR besser zuordnen zu können, nutzen diverse Arbeitsgruppen aber auch selektivere Liganden: Dawson et al., (1991) fanden nach unilateraler Applikation von 8 µg 6-OHDA in das MFB eine signifikante Abnahme der [<sup>3</sup>H]Pirenzepin-Bindung, als relativ spezifischen Marker für mAChR M<sub>1</sub>, von 26% und der [<sup>3</sup>H]QNB-Bindung von ca. 33% im ipsilateralen Striatum. Im Gegensatz dazu berichtet Wang et al., (2014) über signifikante Reduktionen in der [<sup>3</sup>H]Pirenzepin-Bindungsaktivität diverser Hirnareale, nicht aber im Striatum. In den

Untersuchungen von Joyce et al., (1991a) wird mittels 6-OHDA-Läsionierung eine Reduktion der [<sup>3</sup>H]Pirenzepin-Bindung von 15-29% im ipsilateralen Striatum beschrieben. Auch in der vorliegenden Arbeit wird [<sup>3</sup>H]Pirenzepin in der Rezeptorautoradiographie als Ligand für den mAChR M<sub>1</sub> genutzt. Dabei zeigen die Absolutwerte uneinheitliche Ergebnisse, da sowohl Zunahmen (L3W, L6W, L6W3M) als auch Verminderungen (L6W1M, L6W9M) im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden können. Im interhemisphärischen Vergleich wird jedoch eine tendenzielle Reduktion der RD im rechten CPu ipsilateral zur Läsion im Vergleich zur unbehandelten kontralateralen Hirnhälfte ersichtlich, wobei dieser Effekt konstant in allen Untergruppen nachweisbar ist. Am stärksten ausgeprägt ist dieser Effekt hierbei v.a. in den ersten 3 Monaten nach Läsionierung. Diese stets vorhandene rechts-links Verschiebung der RD gibt an dieser Stelle also einen Hinweis auf einen potentiell depressiven Effekt einer 6-OHDA-Injektion auf mAChR M<sub>1</sub>, der aus der Betrachtung der reinen Absolutwerte nicht unmittelbar hervorgeht. Auch sind die absoluten RD hierbei aufgrund der großen SD in allen Untergruppen nur eingeschränkt interpretierbar. Durch die Kontinuität der breiten Streuung der SD nicht nur in der Gruppe L, sondern in allen mit dem Liganden [<sup>3</sup>H]Pirenzepin untersuchten Gruppen, lässt sich eine methodische Fehlerquelle hier nicht sicher ausschließen. Dennoch kann zusammengefasst werden, dass die hier gemachten Beobachtungen sich überwiegend mit den Beobachtungen o.g. Arbeitsgruppen decken, die ebenfalls eine rechts-links Differenz in den RD nach unilateraler 6-OHDA-Applikation ipsilateral zur Läsionsseite nachgewiesen haben. Auch wenn bei den von uns erhobenen Daten keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte, kann doch ein gewisser depressiver Effekt auf die mAChR M<sub>1</sub> nachvollzogen werden. Die im Vergleich zu den nAChR eher milde Reduktion der M<sub>1</sub>-Rezeptordichten, legt die Vermutung nahe, dass dieser Rezeptorsubtyp nicht auf den gleichen neuronalen Strukturen exprimiert sein kann, wie die nAChR, also kein direkter neurotoxischer Effekt mit Neuronenuntergang für die Verminderung der RD ursächlich ist. In der Tat sind hier als subzelluläre Lokalisationen Dendriten und Somata, kleiner bis mittelgroßer striataler Projektionsneurone identifiziert worden (Hersch et al., 1994; Hersch et al., 1995; Yan et al., 2001). Für striatale Projektionsneurone von Säugetieren ist nachgewiesen, dass diese neben einer kleineren Fraktion von Neuropeptiden wie Dynorphin oder Substanz P hauptsächlich GABA als Neurotransmitter synthetisieren (Gerfen, 2004, S. 465). Monoamine wie Dopamin, Noradrenalin oder Serotonin sind für diesen Neuronentyp bisher nicht als Neurotransmitter beschrieben. Demnach kann gemutmaßt werden, dass striatale Projektionsneurone keine entsprechenden Transporter für die Wiederaufnahme von eben diesen Monoaminen exprimieren. Um seine zytotoxische Wirkung über Interaktionen

mit der mitochondrialen Atmungskette und durch Radikalbildung entfalten zu können, muss 6-OHDA zunächst in die Zelle aufgenommen werden (Morin et al., 2014). Dieser Vorgang ist bisher aber nur für das gleichzeitige Vorliegen eben dieser Monoamin-Transporter beschrieben, welche aber allem Anschein nach nicht auf striatalen Projektionsneuronen vorkommen. Ein zytotoxischer Effekt des 6-OHDA als Ursache für Abnahme der RD mAChR M1 im Striatum könnte demzufolge nur infrage kommen wenn: a) 6-OHDA über einen bisher noch nicht beschriebenen, von den Monoamin-Transportern unabhängigen Mechanismus in die Neurone aufgenommen werden würde oder b) 6-OHDA einen extrazellulären zytotoxischen Effekt ausüben würde, der bisher ebenfalls nicht beschrieben ist. Demnach kann eine Reduktion der RD eher nicht auf einer Verminderung der rezeptortragenden Zellen infolge 6-OHDA vermittelter Zytotoxizität beruhen. Ein möglicher Ansatzpunkt wären pharmakokinetische Überlegungen: Möglicherweise ist ein durch die dopaminerge Deafferenzierung des Striatums ausgelöster Hypercholinismus (Spehlmann und Stahl, 1976; Deboer et al., 1993; Rakovska et al., 2003) Ursache einer Herunterregulation der RD auf der Zelloberfläche, ohne die Zellzahl zu vermindern. Infolge der Zerstörung dopaminerger Axonterminalen nimmt der hemmende Einfluss des DA auf die tonisch aktiven CIN ab, wodurch diese enthemmt ACh über das physiologische Maß hinaus freisetzen. Demnach kommt es mit steigender Konzentration des natürlichen Agonisten zur konsekutiven Rezeptordesensibilisierung und Abbau der mAChR von der Zelloberfläche. Auch in der Literatur wird dies als mögliche Ursache diskutiert (Dawson et al., 1991).

Für die autoradiographische Untersuchung der mAChR M<sub>2</sub> nutzen wir [<sup>3</sup>H]Oxotremorin, einen selektiven Rezeptoragonisten an den hochaffinen Bindungsstellen von M<sub>2</sub>. Drei und 6 Wochen nach Läsionierung kann keine wesentliche Veränderung der RD im Vergleich zur Kontrolle oder zur kontralateralen, intakten Hemisphäre gefunden werden. Die Gruppen L6W1M, L6W3M, L6W6M und L6W9M zeigen anschließend jedoch eine leichte Reduktion der RD im rechten CPu von 6% bis über 13% im Vergleich zum kontralateralen CPu der jeweiligen Untergruppe. Für das Striatum sind bisher keine vergleichbaren Daten publiziert, was einen direkten Vergleich nicht zulässt. Hingegen finden sich in der Literatur Ergebnisse zu anderen Hirnstrukturen: Bellerocche et al., (1982) beschreiben infolge einer Injektion von 0,8 µg 6-OHDA in die VTA männlicher Ratten eine signifikante Reduktion der [<sup>3</sup>H]Oxotremorin-Bindung im ipsilateralen NAC. Die Autoren schließen eine Änderung der Bindungsaffinität des Liganden als Ursache der Dichtereduktion aus und vermuten einen Besatz von mAChR auf dopaminergen Terminalen im NAC. Liskowsky und Potter, (1985) untersuchten ebenfalls die Auswirkungen einer Injektion von 8 µg 6-OHDA in die VTA

männlicher Ratten und fanden hierbei eine signifikante Reduktion der [<sup>3</sup>H]Oxotremorin-Bindung in kortikalen Arealen sowie im NAC. Der Subtyp M<sub>2</sub> scheint im Striatum fast ausschließlich auf CIN vorzukommen, wo sie als Autorezeptoren die Acetylcholinfreisetzung modulieren (Bonsi et al., 2011; Levey et al., 1991; Hersch et al., 1994, Hersch et al., 1995; Weiner et al., 1990; Bernard et al., 1992). Da für diesen Neuronentyp bisher keine Monoamine als weitere Neurotransmitter beschrieben sind, ist die Expression von Monoamin-Transportern für diesen Zelltyp unwahrscheinlich. Wie bereits diskutiert mach auch hier das Fehlen von entsprechenden Transporterproteinen eine 6-OHDA-Wirkung als Ursache für die Reduktion der RD unwahrscheinlich. Wie auch bei den anderen Rezeptoren könnte hier eine kompensatorische Herunterregulation von Rezeptoren auf der Zelloberfläche infolge erhöhter Acetylcholinspiegel die Ursache für eine Verminderung der gemessenen RD sein. Die Ergebnisse des M<sub>2</sub> Antagonisten [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 zeigen einen deutlichen Trend, wie er bereits bei dem Agonisten [<sup>3</sup>H]Oxotremorin zu erkennen ist. Ipsilateral zur Kontrollgruppe zeigt sich im rechten CPU aller Untergruppen der Gruppe L eine deutliche Reduktion der RD zwischen 7,3% und 39,9% (L3W: 7,3%; L6W: 27,9%; L6W1M: 22,5%; L6W3M: 39,9%; L6W6M: 27,1%; L6W9M: 28,0%). Auch im interhemisphärischen Vergleich kann in fast jeder Untergruppe eine Verminderung der RD zwischen 15,1% und 19,9% im ipsilateral zur Läsion liegenden rechten CPU nachgewiesen werden (L6W: 19,9%; L6W1M: 18,7%; L6W3M: 15,6%; L6W6M: 16,5%; L6W9M: 15,1%). Ein direkter zytotoxischer Effekt des 6-OHDA ist, mit Verweis auf den weiter oben bereits dargelegten Zusammenhang zwischen Toxizität des 6-OHDA und der zellulären Lokalisation der Rezeptoren, eher unwahrscheinlich. Dass die absoluten RD die des Liganden [<sup>3</sup>H]Oxotremorin um ein Vielfaches übersteigen, ist vermutlich Ausdruck der Eigenschaft von [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 der niedrigen Affinität von [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 zu M<sub>2</sub>. Hierbei sind relative hohe Konzentrationen des Liganden erforderlich, um eine Bindung an M<sub>2</sub> zu erreichen. Dies führt jedoch dazu, dass auch andere mAChR markiert werden. Die Selektivität von [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 wird in der Literatur uneinheitlich bewertet. Aubert et al., (1992) weisen [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 als relativen selektiven M<sub>2</sub>-Antagonisten aus. Dagegen zeigen Untersuchungen am humanen ZNS, dass [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 in höheren Konzentrationen auch M<sub>4</sub> markieren kann (Piggot et al., 2002). Daher kann bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen von 5 nM [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 eine Doppelmarkierung von M<sub>2</sub>, als auch M<sub>4</sub> mit Einfluss auf die absolut gemessenen RD nicht ausgeschlossen werden. Nach meinem Wissensstand erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig die differenzierte Untersuchung der RD des Subtyp M<sub>3</sub> im 6-OHDA-Hemiparkinsonmodell der Ratte. Dabei zeigt sich sowohl ipsilateral,

als auch kontralateral zur Läsion eine Reduktion der absoluten RD im Vergleich zur Kontrolle. Für das rechte, läionierte CPu streut die Reduktion der RD im Vergleich zur ipsilateralen Kontrolle zwischen 30,3% und 40,9% (L3W: 37,3%; L6W: 40,9%; L6W1M: 30,3%; L6W3M: 40,5%; L6W6M: 31,7%; L6W9M: 35,1%). Im interhemisphärischen Vergleich ist ebenfalls eine tendenziell stärkere Reduktion auf der läionierten rechten Hemisphäre erkennbar, wobei die RD im rechten CPu stets eine Reduktion zwischen 2,0% und 8,7% erfährt (L3W: 5,3%; L6W: 2,0%; L6W1M: 8,7%; L6W3M: 6,8%; L6W6M: 5,3%; L6W9M: 4,9%). Unter Betrachtung der Lokalisation von M<sub>3</sub> auf striatalen Projektionsneuronen sowie kortikalen und thalamostriatalen Afferenzen (Levey et al., 1994; Hersch et al., 1994; Hersch et al., 1995; Yan et al., 2001), ist aufgrund der fehlenden anatomischen und biochemischen Voraussetzungen ein direkter zytotoxischer Effekt des 6-OHDA als Ursache der Dichtereduktion unwahrscheinlich. Denkbar wäre auch hier ein pharmakodynamischer Effekt mit Rezeptordownregulation durch erhöhte striatale ACh-Konzentrationen infolge der dopaminergen Deafferenzierung. Daneben, sollte die ACh-Konzentrationen im kontralateralen Striatum von einer unilateralen 6-OHDA-Injektion unbeeinflusst bleiben. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre ein generell depressiver Effekt der stereotaktischen Injektion auf die RD im gesamten Rattenhirn, wie weiter unten ausgeführt wird. Auffällig ist weiterhin, dass ab der Gruppe L6W1M die RD tendenziell wieder zunehmen. Je länger die Läsionierung also überlebt wird, scheint die RD wieder anzusteigen. Dies könnte ein Hinweis auf neuroregeneratorische Vorgänge oder einen zeitlich begrenzten Effekt des 6-OHDA sein. Zusammenfassend zeigt also auch die vorliegende Promotionsarbeit in weitestgehender Übereinstimmung mit der Literatur eine Reduktion der RD von M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> und erstmals M<sub>3</sub> infolge einer intrazerebralen 6-OHDA-Injektion.

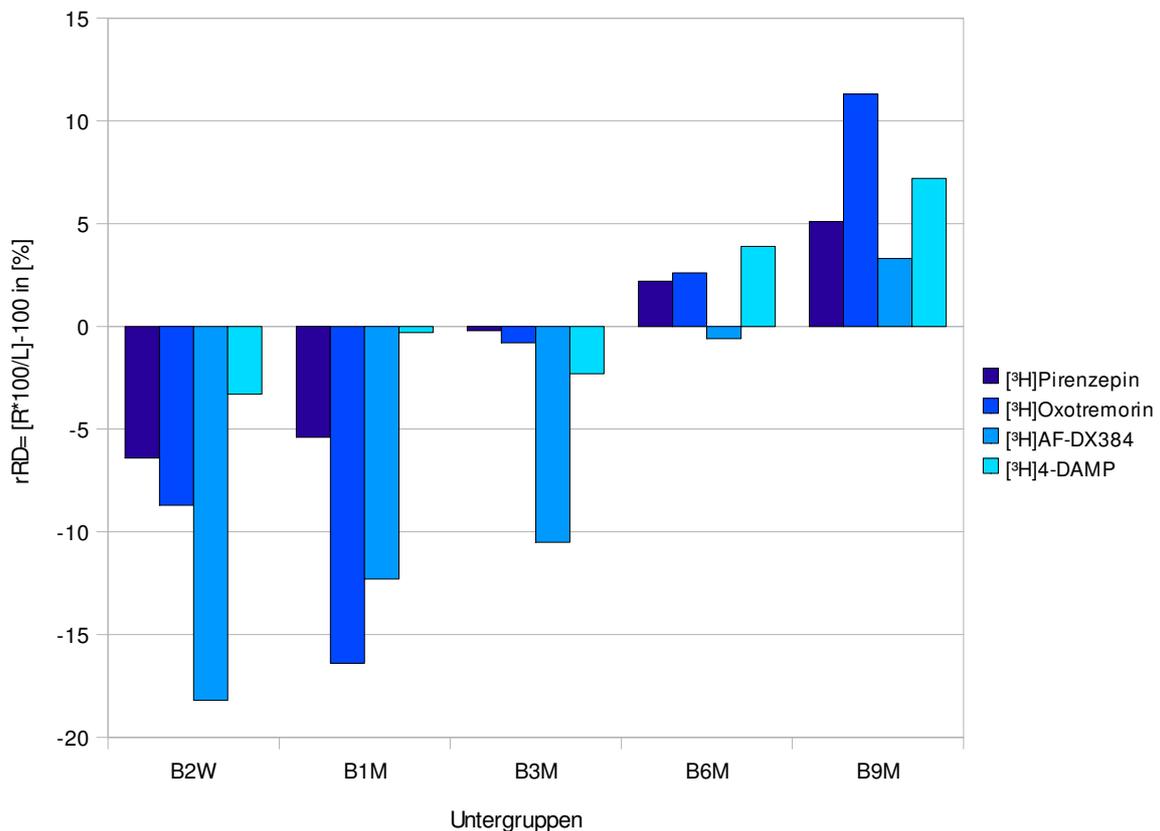
#### **4.3 Rezeptordichteverteilung nach unilateraler BoNT-A-Injektion**

In der Literatur sind bisher nur wenige Untersuchungen zur Interaktion von BoNT-A mit nAChR beschrieben. Injektionsversuche an peripherem Muskelgewebe von Ratten zeigen eine Zunahme der RD von nAChR im behandelten Muskel nach einer ipsilateralen BoNT-A-Applikation (Frick et al., 2007). Indirekte Hinweise auf eine mögliche Erhöhung der nAChR liefern Untersuchungen welche eine gesteigerte nAChR-Genexpression, ebenfalls infolge BoNT-A-Injektion, im peripheren Muskelgewebe von Nagetieren nachweisen (Ma et al., 2004; Shen et al., 2005). Vermutet wird von den Autoren in diesem Zusammenhang als möglich Ursache ein kompensatorischer Mechanismus zur Überbrückung der durch das

Neurotoxin induzierten Verminderung der Acetylcholinfreisetzung aus den Axonterminalen. Für die Anwendung von BoNT im ZNS, gibt Hawlitschka et al., (2013) eine zusammenfassende Übersicht. Leider sind hierbei bisher keinerlei Daten zu möglichen Auswirkungen von BoNT auf neuronale Transmitterrezeptoren beschrieben.

Die im Verlauf dieser Dissertation erhobenen Daten können die oben beschriebenen Effekte für das zentralnervöse Kompartiment nur teilweise bestätigen. Im interhemisphärischen Vergleich kann in den Gruppen B2W, B1M und B3M im Gegensatz zu den Beobachtung im peripherem Gewebe jeweils eine Zunahme der RD zwischen 8,7% bis 11% ipsilateral zur Injektionsseite beobachtet werden. Dieser Effekt kann in den späteren Zeitgruppen nach 6 und 9 Monaten jedoch nicht mehr nachvollzogen werden (vgl. B6M:  $317 \pm 23$  [fmol/mg Protein] links vs.  $317 \pm 17$  [fmol/mg Protein] rechts und B9M:  $324 \pm 25$  [fmol/mg Protein] links vs.  $325 \pm 16$  [fmol/mg Protein] rechts). Dies könnte Ausdruck eines zeitliche begrenzten BoNT-A-Effektes sein. Möglicherweise spielen hier auch ähnliche kompensatorische Mechanismen in der Veränderung und Hochregulation von Genexpressionsmustern mit nachfolgender Anhebung der Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche wie bei den oben beschriebenen peripheren nAChR eine Rolle. Eine entsprechende Wirkung des BoNT-A für das ZNS mit einer Spaltung des SNARE-Komplexes und konsekutiver Verhinderung einer Acetylcholinfreisetzung aus synaptischen Vesikeln wurde unlängst beschrieben (Rossetto et al., 2014; Hawlitschka et al., 2013). Auffällig ist daneben auch die gemessene bilaterale signifikante Reduktion der RD 3, 6 und 9 Monate nach unilateraler BoNT-A-Injektion im Abgleich mit der unbehandelten Kontrolle. Die Bilateralität dieses Effektes, könnte mit der Fähigkeit des Botulinumtoxins zur neuronalen und axonalen Migration auch weit über den ursprünglichen Applikationsort hinaus zusammenhängen, wie er von Antonucci et al. (2008) beschrieben wurde. Zur direkten Interaktion zwischen BoNT und mAChR ist bisher ebenfalls nur wenig veröffentlicht: Schmidt et al., (1996) zeigen an humanen embryonalen Nierenzellen durch Applikation von BoNT-B eine Hemmung der Signaltransmission zwischen mAChR und PLD. Hierbei ist jedoch weder eine Veränderung der RD auf der Zelloberfläche, noch eine Affektion der Rezeptor-Protein Interaktion zwischen mAChR und G-Proteinen beobachtet worden. Linseman et al., (2000) stellen eine BoNT-B induzierte Hemmung des mAChR-FAK-Signalweges fest, welcher regulatorische Funktion in der zytoskelettalen Organisationsstruktur hat. Eine Messung der RD fand hierbei allerdings nicht statt. Vergleicht man die Ergebnisse der Liganden [ $^3\text{H}$ ]Pirenzepin, [ $^3\text{H}$ ]Oxotremorin, [ $^3\text{H}$ ]AF-DX 384 und [ $^3\text{H}$ ]4-DAMP der mAChR-Subtypen  $M_1$ ,  $M_2$  und  $M_3$  in den Gruppen der ausschließlich mit BoNT-A behandelten Tiere, so fällt ein bei allen Liganden stets vorhandener

interhemisphärischer Effekt mit sich über 9 Monate entwickelnder Dynamik auf: In allen Untergruppen, welche zwei Wochen nach der BoNT-A Injektion untersucht wurden (B2W), liegt die RD ipsilateral zur Injektion zunächst niedriger als im linken CPu der kontralateralen Hemisphäre. Diagramm 21 illustriert hierzu die Veränderung der interhemisphärischen Differenzen im zeitlichen Verlauf.



**Diagramm 21: Interhemisphärische Differenzen der relativen RD der Gruppe aller Liganden im zeitlichen Verlauf.** rRD: relative Rezeptordichte; R: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte rechtes CPu; L: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte linkes CPu. Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

Die relative RD beträgt hierbei für [<sup>3</sup>H]Pirenzepin rund -6,4 %, für [<sup>3</sup>H]Oxotremorin rund -8 %, für [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 rund -18,2 % und für [<sup>3</sup>H]4-DAMP rund -3,3 %. Dieses Verhältnis verschiebt sich im zeitlichen Verlauf, sodass nach 6 Monaten ([<sup>3</sup>H]Pirenzepin, [<sup>3</sup>H]Oxotremorin, [<sup>3</sup>H]4-DAMP) bzw. 9 Monaten ([<sup>3</sup>H]AF-DX 384) Beobachtungszeitraum, die RD im rechten CPu ([<sup>3</sup>H]Pirenzepin: 5,1%; [<sup>3</sup>H]Oxotremorin: 11,3%; [<sup>3</sup>H]AF-DX 384: 3,3%; [<sup>3</sup>H]4-DAMP: 7,3%). Auch bei Betrachtung der Absolutwerte in der Gruppe B des jeweiligen Liganden kann dieser Effekt nachvollzogen werden (s. Diagramm 7 S. 36; Diagramm 11 S. 41; Diagramm 15 S. 46; Diagramm 19 S. 51). Die hier beschriebenen

Veränderungen weisen also darauf hin, dass je länger die Injektion von BoNT-A überlebt wird, umso stärker steigt die RD ipsilateral zur Injektion nach initialer Reduktion ipsilateral an und übersteigt ab einem bestimmten Zeitpunkt sogar die RD im kontralateralen CPU um bis zu 11% ( $[^3\text{H}]$ Oxotremorin B9M). Diese zeitlich limitierte Reduktion der RD suggeriert dabei eine nur temporär auftretende, reversible Wirkung des Neurotoxins auf die Rezeptordichteverteilung. Ein möglicher Erklärungsansatz für die initiale Reduktion der RD wäre ein direkt neurodestruktiver Effekt von BoNT auf die rezeptortragenden Zellpopulationen, ähnlich dem bereits für 6-OHDA beschriebenen. Demnach wäre also ein Zelltod mit konsekutiver Abnahme der RD ursächlich für die beobachteten Veränderungen. Für eine direkte und indirekte Schädigung von Neuronen mit nachfolgendem Zelluntergang durch BoNT gibt es in der Literatur tatsächlich Hinweise: Berliocchi et al., (2005) berichten über in-vitro Versuche an zerebellären Granulazellen mit BoNT-C, bei denen eine frühe Degeneration der Neuriten und eine späte totale Apoptose der Neuronen beobachtet werden konnte. Die Autoren berichten über einen innerhalb der ersten achtzehn Stunden nach BoNT-C-Applikation einsetzenden zytoskelettalen Abbau durch immunhistochemisch gemessene Verminderung des Aktins innerhalb der Zellen. Auch wird eine gestörte Mikrotubulifunktion infolge veränderter Phosphorylierungsmuster der Tau-Proteine beschrieben. Diese Veränderungen hätten zur Störung der neuronalen Mitochondrienfunktion geführt, was letztlich über die Freisetzung proapoptotischer Mediatoren wie Cytochrom C und Aktivierung der Caspase-3 den kontrollierten Zelltod ausgelöst haben soll. Diese Beobachtungen weisen eine gewisse Ähnlichkeit mit den Untersuchungen von Linseman et al., (2000) auf, welcher für das BoNT-B eine Interaktion mit zellulären Strukturelementen via mAChR nachgewiesen hat. Interessanterweise berichten die Autoren auch über Versuche mit BoNT-A, wobei sie hier jedoch keine Veränderungen der zytoskelettalen Architektur und Funktion oder einen neuronalen Zelltod festgestellt haben (Berliocchi et al., 2005). Mikroskopisch auffällig waren allerdings Schwellungen im Bereich der synaptischen Terminalen, die von den Autoren als morphologisches Korrelat zum Verlust der zytoskelettalen Integrität gesehen werden. Auftreibungen im Bereich von Nervenzellen wurden auch von unserer Arbeitsgruppe im Zusammenhang mit BoNT-A mehrfach beschrieben (Wree et al., 2010; Brosig, 2014; Antipova et al., 2013; Hawlitschka, 2012), jedoch kongruent zu o.g. Ergebnissen, ohne Hinweis auf neuronalen Schaden oder Zelltod (Mehlan et al., 2016; Antipova et al., 2013). Im Gegensatz dazu kann in anderen Arbeiten auch für BoNT-A gezeigt werden, dass nach Injektion in die Prostata von Hunden, Ratten und in die Speicheldrüsen von Hasen gewebliche Atrophie und Apoptose auftreten, z.T. unter Nachweis proapoptotischer Signalmoleküle

(Cuang et al., 2006; Gorgal et al., 2012; Shan et al., 2013). Zusammengenommen scheinen also verschiedene Subtypen von BoNT in neuronalem Gewebe in-vitro und nicht-neuronalem Gewebe in-vivo sowohl über mAChR-assoziierte als auch AChR-unabhängige Signalkaskaden strukturelle Veränderungen und kontrollierten Zelltod auslösen zu können und die RD beeinflussen. Ob dies auch als Ursache für die vorliegenden Ergebnisse gelten kann, ist allerdings unwahrscheinlich, da bisher nicht gezeigt werden konnte, dass konkret BoNT-A in neuronalem Gewebe in-vitro oder in-vivo direkt oder indirekt zum Zellschaden oder -tod führt. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe legen eher Gegenteiliges nahe (Antipova et al., 2013; Mehlan et al., 2016). Weiterhin stellt sich die Frage, wie ein neurodestruktiver Effekt infolge BoNT-A-Applikation mit dem von uns beobachteten Wiederanstieg der RD vereinbar wäre. Wie bereits für 6-OHDA an nAChR in dieser Promotionsarbeit gezeigt werden konnte, sind 6-OHDA-vermittelte Reduktionen durch induzierten Zelltod mit nachfolgendem Abbau der Rezeptoren über einen Zeitraum von 9 Monaten irreversibel, ohne Hinweis auf regenerations Effekte. Neben der Reduktion der RD durch zellulären Untergang ist dagegen auch ein rein pharmakodynamischer Ansatz zu diskutieren: Aus der Literatur ist bekannt, dass die andauernde Exposition mit einem Agonisten oder Antagonisten an mAChR die Expression der einzelnen Subtypen an der Zelloberfläche verringern (Agonist), oder erhöhen (Antagonist) kann (Fryer et al., 2012, S.62-63). Diese Vorgänge werden entweder als agonisten-induzierte Rezeptor-Downregulation oder antagonist-induzierte Rezeptor-Upregulation bezeichnet (Fryer et al., 2012, ebd.). Wie bereits ausgeführt, verfügen alle Subtypen von BoNT über die Fähigkeit, die Freisetzung von Transmittern aus den synaptischen Vesikeln der präsynaptischen Axonterminalen zu hemmen (s. 1.5 Botulinumneurotoxine). Folglich kann vermutet werden, dass auch nach intrazerebraler Injektion von BoNT-A in eine Hirnregion, die Freisetzung diverser Neurotransmittern aus den dort vorhandenen Axonterminalen zumindest in einem bestimmten Bereich um die Injektionsstelle unterbunden wird. Damit verbunden wäre auch ein Absinken der Konzentration freien ACh in unmittelbarer Umgebung zur Injektion. Gemäß den hier vorliegenden Ergebnissen bedeutet dies aber, dass eine Verringerung der Konzentration eines natürlichen Agonisten (ACh) am mAChR eine Reduktion der RD von M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> und M<sub>3</sub> zur Folge hat. Diese Beobachtungen können demnach nicht mit den klassischen Vorstellungen einer agonisten- oder antagonist-induzierten Alteration von mAChR an der Zelloberfläche in Einklang gebracht werden. Einen Erklärungsansatz könnte die Arbeit von Shan et al., (2013) liefern, in der neben den bereits aufgeführten Ergebnissen eine Verringerung der Expression von M<sub>3</sub> – mRNA nachgewiesen ist. Demnach wäre eine Beeinflussung der

Proteinsynthese durch BoNT direkt auf Gen-Ebene vorstellbar. Ebenfalls denkbar wäre eine Interaktion von BoNT mit diversen Proteinen und Signalwegen, die bereits im komplexen subtypenspezifischen Internalisierungsprozess der mAChR beschrieben ist (Fryer et al., 2012, S. 64-66). Über die genauen molekularen Mechanismen kann zu diesem Zeitpunkt aufgrund der noch unzureichenden Datenlage nur spekuliert werden, weshalb es nötig ist, die Forschung in dieser Richtung weiter voran zu bringen. Klar gezeigt werden konnte jedoch im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit, dass eine intrastriatale BoNT-A-Injektion die RD der nAChR und mAChR auf dynamische Weise zu modulieren vermag.

#### 4.4 Rezeptordichteverteilung nach unilateraler 6-OHDA- und anschließender BoNT-A-Injektion

Für die nAChR zeigen die Ergebnisse der Ligandenbindungsversuche mit [<sup>3</sup>H]Epibatidin im Vergleich der rein mit 6-OHDA läsierten Tiere mit denen der zusätzlich BoNT-A behandelten Versuchstiere unter Berücksichtigung der zeitlichen Paarung stets eine erhöhte RD ipsilateral zur Injektion bei den Versuchstieren, welche zusätzlich eine Injektion von BoNT-A erhalten haben. Dabei liegen die RD des rechten CPu in der Gruppe LB um 5,4% bis 14,5% über den RD ipsilateral in der Gruppe L. Tabelle 5 liefert hierzu eine Übersicht. Dies bedeutet, dass BoNT-A den 6-OHDA-bedingten Verlust nAChR im CPu zumindest teilweise aufhebt. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür

**Tabelle 5: Relative Veränderung der RD im interhemisphärischen Vergleich für [<sup>3</sup>H]Epibatidin - nAChR.** rRD: relative Rezeptordichte; R: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte rechtes CPu; L: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte linkes CPu. Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

##### [<sup>3</sup>H]Epibatidin-nAChR

Untergruppen 6-OHDA	rRD = R*100/L in [%]	Untergruppen 6-OHDA+BoNT-A	rRD = R*100/L in [%]
L6W1M	44,6	LB6W1M	59,1
L6W3M	42,1	LB6W3M	47,5
L6W6M	44,3	LB6W6M	53,2
L6W9M	38,9	LB6W9M	49,7

wäre eine kompensatorische Zunahme der RD auf Zellen im CPu. Diese striatalen Zellpopulationen müssten sich aber von den Zellen und Axonästen der nigrostriatalen Afferenzen unterscheiden, da gemäß den Ergebnissen der Läsionierungsexperimente und unter Beachtung der bereits in der Literatur beschriebenen präsynaptischen Lokalisation nAChR auf Axonterminalen der SN, eine Injektion von 6-OHDA in das MFB zu einer

Zerstörung und axonalen Degeneration eben dieser nigrostriatalen Afferenzen geführt haben muss. Denkbar wäre demnach, dass bereits nAChR-tragende Axone anderen zerebralen Ursprungs und Perikarya intrastriataler Neurone ihren Rezeptorbesatz hoch reguliert haben. Potentiell dafür infrage kommen würden kortikostriatale Afferenzen (Garcia-Munoz et al., 1996) sowie cholinerge (Sandor et al., 1991) und GABAerge (Rover et al., 2002; Koos und Tepper, 2002; McClure-Begle et al., 2009) Interneurone innerhalb des Striatums. Auch die autoradiographischen Messungen der Liganden  $^3\text{H}$ Pirenzepin,  $^3\text{H}$ Oxotremorin,  $^3\text{H}$ AF-DX 384 und  $^3\text{H}$ 4-DAMP lassen Rückschlüsse auf einen modulierenden Effekt des BoNT-A zu. Wie bereits in Abschnitt 4.2 ausgeführt, ist die RD in der Gruppe L nach 6-OHDA-Applikation ipsilateral geringer als im kontralateralen CPu der jeweiligen Untergruppe. Dieser Effekt kann für M1, M2 und M3 beobachtet werden. Vergleicht man nun die Ergebnisse der Gruppen L und LB von M1, M2 und M3 für jeweils das rechte CPu, so zeigt sich in fast allen Untergruppen eine Zunahme der RD ipsilateral in der Gruppe LB gegenüber der Gruppe L. Die Tabellen 6 bis 9 geben hierzu eine Übersicht. Demnach hebt eine Injektion von BoNT-A den Läsionseffekt im Striatum zumindest teilweise auf. Eine zentrale Bedeutung in der Aufklärung dieser Ergebnisse kommt dabei den bereits beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen im Striatum mit Entwicklung eines hypercholinergen Ungleichgewichts infolge dopaminerger Deafferenzierung auf Transmitterebene zu. In einem Hirnareal, für das nach neuronaler Deafferenzierung und dopaminerger Entkopplung eine enthemmte und übermäßige Freisetzung von ACh beschrieben ist (Spehlmann und Stahl, 1976; DeBoer et al., 1993; Rakovska et al., 2003), kann gem. den Ergebnissen der Gruppe L eine agonisten-induzierte Rezeptor-Downregulation angenommen werden, zumal dieser pharmakodynamische Mechanismus weithin beschrieben ist (Fryer et al., 2012, S. 62-64). BoNT-A könnte hier über eine Hemmung der Freisetzung von ACh aus neuronalen Strukturen des Striatums ansetzen und unter konsekutiver Abnahme der Acetylcholkonzentration einer Rezeptor-Downregulation entgegenwirken. Gemäß den Ausführungen diverser Übersichtsarbeiten (Calabresi et al., 1999; Zhou et al., 2002; Kreitzer et al., 2009; Wilson et al., 2009; Oldenburg und Ding, 2011), sind CIN trotz ihres geringen Anteils von nur 1-3% der Gesamtneuronenzahl im Striatum, maßgeblich für die hohen striatalen Acetylcholkonzentration verantwortlich. Daneben ist ein partieller cholinerges Input aus pedunculopontinen Kernen beschrieben, welcher aber eher eine geringe Rolle spielen dürfte (Calabresi et al., 2000). Wie bereits ausführlich in der Dissertation von Brosig (2014) dargelegt wurde, nutzt BoNT-A das Protein SV2, welches zur Aufnahme des Toxins in die

**Tabelle 6: Relative Veränderung der RD im interhemisphärischen Vergleich für [<sup>3</sup>H]Pirenzepin - M<sub>1</sub>.** rRD: relative Rezeptordichte; R: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte rechtes CPu; L: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte linkes CPu. Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

**[<sup>3</sup>H]Pirenzepin - M<sub>1</sub>**

Untergruppen 6-OHDA	rRD = R*100/L in [%]	Untergruppen 6-OHDA+BoNT-A	rRD = R*100/L in [%]
L6W1M	87,3	LB6W1M	92,8
L6W3M	90,6	LB6W3M	96,8
L6W6M	94,7	LB6W6M	98,1
L6W9M	95,1	LB6W9M	98,1

**Tabelle 7: Relative Veränderung der RD im interhemisphärischen Vergleich für [<sup>3</sup>H]Oxotremorin - M<sub>2</sub>.** rRD: relative Rezeptordichte; R: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte rechtes CPu; L: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte linkes CPu. Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

**[<sup>3</sup>H]Oxotremorin - M<sub>2</sub>**

Untergruppen 6-OHDA	rRD = R*100/L in [%]	Untergruppen 6-OHDA+BoNT-A	rRD = R*100/L in [%]
L6W1M	86,7	LB6W1M	90,6
L6W3M	94	LB6W3M	93,4
L6W6M	93,1	LB6W6M	99,9
L6W9M	92,6	LB6W9M	99

**Tabelle 8: Relative Veränderung der RD im interhemisphärischen Vergleich für [<sup>3</sup>H]AF-DX 384 - M<sub>2</sub>.** rRD: relative Rezeptordichte; R: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte rechtes CPu; L: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte linkes CPu. Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

**[<sup>3</sup>H]AF-DX 384**

Untergruppen 6-OHDA	rRD = R*100/L in [%]	Untergruppen 6-OHDA+BoNT-A	rRD = R*100/L in [%]
L6W1M	81,3	LB6W1M	80
L6W3M	84,4	LB6W3M	83,6
L6W6M	83,5	LB6W6M	90,1
L6W9M	84,9	LB6W9M	93,7

**Tabelle 9: Relative Veränderung der RD im interhemisphärischen Vergleich für [<sup>3</sup>H]4-DAMP – M<sub>3</sub>. rRD:** relative Rezeptordichte; R: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte rechtes CPU; L: area-gewichtete mittlere Rezeptordichte linkes CPU. Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

**[<sup>3</sup>H]4-DAMP - M<sub>3</sub>**

<b>Untergruppen 6-OHDA</b>	<b>rRD = R*100/L in [%]</b>	<b>Untergruppen 6-OHDA+BoNT-A</b>	<b>rRD = R*100/L in [%]</b>
<b>L6W1M</b>	91,3	<b>LB6W1M</b>	93,5
<b>L6W3M</b>	93,2	<b>LB6W3M</b>	95,1
<b>L6W6M</b>	94,7	<b>LB6W6M</b>	99,9
<b>L6W9M</b>	95,1	<b>LB6W9M</b>	100,3

Nervenzelle benötigt wird. Der Subtyp C dieses Proteins, soll gemäß Brosig im Striatum u.a. auf CIN, nicht aber auf GABAergen Interneuronen exprimiert sein. Demnach stellt das Vorhandensein von SV2C auf den maßgeblich an der Acetylcholinomöostase beteiligten CIN des Striatums, einen idealen Angriffspunkt für BoNT-A dar. Die Vorstellung einer damit verbundenen Abnahme der AcetylcholinKonzentration und konsekutiver Hochregulation von mAChR gemäß pharmakologischer Wirkprinzipien, erscheint demnach eine plausible Erklärung. Bestätigung könnte diese Annahme in einer von unserer Arbeitsgruppe bereits publizierten Untersuchung an ebenfalls mit BoNT-A – hemiläsionierten Ratten finden (Wree et al., 2011; Antipova et al., 2017). In Rotationsexperimenten ist an 6-OHDA-läsionierten Tieren nach intrastriatler BoNT-A-Injektion ein durch den D<sub>2</sub>-Agonisten Apomorphin induziertes pathologisches Rotationsverhalten nicht mehr nachweisbar. Die Autoren mutmaßen hier ebenfalls, dass als einer der zugrunde liegenden Pathomechanismen eine Verminderung der striatalen Acetylcholinsekretion zur Aufhebung des pathologischen Hypercholinismus geführt haben könnte, was schließlich funktionell wieder in einer ausgeglichenen motorischen Funktion der BG resultiert. Das in diesem komplexen Zusammenhang neben mAChR auch Rezeptoren anderer Transmittersysteme wie bspw. D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> involviert sind, zeigt auch eine kürzlich publizierte Arbeit, dass BoNT-A über eine Reduktion pathologische erhöhter Rezeptoren vom Subtyp D<sub>2</sub> im Hemiparkinsonmodell der Ratte zur Normalisierung der RD auf Kontrollniveau führt und damit eine Verbesserung der motorischen Eigenschaften der Versuchstiere in Verhaltensuntersuchungen einhergeht (Wedekind et al., 2017). Mit Blick auf eine zukünftige weiterführende Erprobung ist außerdem hervorzuheben, dass bisher keine zentralen oder peripheren Nebenwirkungen in der intrazerebralen Anwendung von BoNT-A beobachtet werden konnten (Wree et al., 2011; Antipova et al., 2017; Wedekind et al., 2017).

#### 4.5 Rezeptordichteverteilung der Gruppen L, LB und LV im Vergleich

Um einerseits den Einfluss einer zweiten stereotaktischen Injektion im Sinne eines operativen Traumas auf die RD ipsilateral auszuschließen und andererseits den Trendeffekt der BoNT-A-Injektion auf die RD gegenüber den Veränderungen nach 6-OHDA aufzuzeigen, wurden einigen Tieren statt des Toxins das BV ipsilateral in das rechte CPu injiziert. In Tabelle 10 sind die interhemisphärischen Differenzen innerhalb der jeweiligen Untergruppen als relative RD in den Gruppen L, LB und LV gegenübergestellt.

**Tabelle 10: Gegenüberstellung relativen RD der Gruppen 6-OHDA; 6-OHDA+BoNT-A und 6-OHDA+BV aller Liganden im zeitlichen Verlauf.** R: area-gewichtete mittlere RD rechtes CPu; L: area-gewichtete mittlere RD linkes CPu; 6W1M: 6 Wochen und 1 Monat nach Behandlung; 6W3M: 6 Wochen und 3 Monate nach Behandlung. N/A: Daten nicht verfügbar. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

Rezeptor- [ <sup>3</sup> H]Ligand	Zeit- intervalle	6-OHDA Relative RD = R*100/L in [%]	6-OHDA+BoNT-A Relative RD = R*100/L in [%]	6-OHDA+BV Relative RD = R*100/L in [%]
nAChR - [ <sup>3</sup> H]Epibatidin	6W1M	44,6	59,1	49,1
	6W3M	42,1	47,5	38,1
	6W6M	44,3	53,2	N/A
	6W9M	38,9	49,7	N/A
mAChR M <sub>1</sub> - [ <sup>3</sup> H]Pirenzepin	6W1M	87,3	92,8	93,4
	6W3M	90,6	96,8	92,1
	6W6M	94,4	98,1	N/A
	6W9M	95,1	98,1	N/A
mAChR M <sub>2</sub> - [ <sup>3</sup> H]Oxotremorin	6W1M	86,7	90,6	97,8
	6W3M	93,5	93,4	94,5
	6W6M	93,1	99,9	N/A
	6W9M	92,6	99,0	N/A
mAChR M <sub>2</sub> - [ <sup>3</sup> H]AF-DX 384	6W1M	81,3	80,0	86,4
	6W3M	84,4	83,6	84,8
	6W6M	83,5	90,1	N/A
	6W9M	84,9	93,7	N/A
mAChR M <sub>3</sub> - [ <sup>3</sup> H]4-DAMP	6W1M	91,3	93,5	100,8
	6W3M	93,2	95,1	96,5
	6W6M	94,7	99,9	N/A
	6W9M	95,1	100,3	N/A

Für die nAChR wird ersichtlich, dass zwischen den interhemisphärischen Differenzen der RD in den Gruppen L und LV nur geringe Abweichungen bestehen. Dies kann Hinweis darauf sein, dass eine zweizeitige operative Traumatisierung des Hirns nur geringe Veränderungen in den RD der nAChR bewirkt. Allerdings muss hier darauf hingewiesen werden, dass für Gruppe LV nur Daten in einem Zeitraum bis 3 Monate nach Vehikelinjektion vorliegen. Dies ist den limitierten Ressourcen dieser umfangreichen Untersuchungsreihe geschuldet.

Vergleicht man nun die relativen RD der Gruppen L und LB, so zeigt sich deutlich die Zunahme der RD in der Gruppe der zusätzliche mit BoNT-A behandelten Tiere, welche die relativen RD der Gruppe L stets um bis zu 14,5% (6W1M) übersteigen. Auch bei den mAChR ist dieser Trend nachvollziehbar: In allen hier aufgeführten Zeitintervallen nach BoNT-A-Applikation übersteigen die relativen RD der Gruppe LB um bis zu 6,2% (6W3M [<sup>3</sup>H]Pirenzepin), 6,4% (6W9M [<sup>3</sup>H]Oxotremorin), 8,8% (6W9M [<sup>3</sup>H]AF-DX 384) und 5,2% (6W6M und 6W9M [<sup>3</sup>H]4-DAMP) die RD der Gruppe L. Einzige Ausnahme hierbei findet sich für den Liganden [<sup>3</sup>H]Oxotremorin im Zeitintervall 6W3M. Bezieht man nun die relativen RD der Gruppe LV mit in diesen Abgleich ein, so lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der Zeitintervalle 6W1M und 6W3M der Gruppe LV sich den relativen RD der Gruppen L und LB für die mAChR annähern. Einzige Ausnahme hiervon bildet die Gruppe 6W3M des Liganden Pirenzepin. Dies deutet darauf auch hier darauf hin, dass eine zweizeitige stereotaktische Injektion zumindest in dem untersuchten Zeitraum zu keinen wesentlichen Veränderung der RD im Vergleich mit den Ergebnissen der rein 6-OHDA-läsionierten Tiere führt. Die Daten erwecken aber auch den Anschein, dass eine BoNT-A-Injektion bis 3 Monate nach Injektion den gleichen Effekt wie die Injektion des BV auf die Verteilung der RD hat. Dagegen spricht allerdings die Auswertung der Ergebnisse 6 und 9 Monate nach den Injektionsversuchen. Die erhobenen Daten der Liganden [<sup>3</sup>H]Pirenzepin, [<sup>3</sup>H]Oxotremorin und [<sup>3</sup>H]4-DAMP zeigen eine deutlich Zunahme der RD mit nahezu Angleich an die RD des kontralateralen unbehandelten CPu. Auch ist bei allen untersuchten Liganden der mAChR ein positiver Gesamttrend mit steter Zunahme der relativen RD über den Zeitraum von 9 Monaten nach BoNT-A-Applikation nachweisbar. Hingegen zeigen die relativen RD der Gruppe LV nach 3 Monaten stets eine Abnahme der relativen RD im Vergleich zu den Ergebnissen 1 Monat nach Injektion. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die zweizeitige intrazerebrale Injektion keine größeren Auswirkung auf die Verteilung der RD im ipsilateralen CPu hat und dass BoNT-A die Verminderung der RD ipsilateral infolge 6-OHDA-Injektion in begrenztem Umfang aufzuheben vermag.

#### **4.6 Auswirkungen experimenteller Traumata auf die Rezeptordichteverteilung im Striatum der Ratte**

Aus der Literatur ist bekannt, dass Traumata unterschiedlichster Genese neben morphologischen Veränderungen die Dichteverteilung von Rezeptoren beeinflussen können (Donat et al., 2008; Rogozinska et al., 2010; DeAngelis et al., 1994; Jiang et al., 1994). Demnach ist auch denkbar, dass eine stereotaktische Injektion in das Rattenhirn als, wenn

auch geringes mechanisches Trauma einen solchen modulierenden Einfluss auf die RD ausüben könnte. Hawlitschka, (2012) verweist bezüglich morphologischer Veränderungen im Rahmen seiner Promotionsarbeit bei der Abhandlung über axonale Schwellungen infolge intrastriataler stereotaktischer BoNT-A-Injektionen in Rattenhirne auf diverse Autoren und Arbeitsgruppen, welche eben diese oder ähnliche Phänomene infolge der experimentellen Induktion mechanischer Trauma gegen Hirne verschiedener Versuchstiere untersuchen (Hawlitschka, 2012, S. 99-100). Alterationen auf Rezeptorebene in verschiedenen Hirnarealen infolge mechanischer Traumata sind ebenfalls beschrieben: DeAngelis et al., (1994) zeigt unter Nutzung des Flüssigkeits-Perkussionsmodells eine signifikante Abnahme der RD von M<sub>2</sub> im Hippocampus sowie M<sub>1</sub> in kortikalen Arealen. Verbois et al., (2002) zeigt eine Reduktion von nAChR und mAChR sowohl ipsi- als auch kontralateral in kortikalen und hippocampalen Arealen sowie dem Gyrus dentatus nach kontrolliertem Hirntrauma. Donat et al., (2008) berichtet infolge kontrollierter Masseneinwirkung auf die Gehirne männlicher Sprague-Dawley Ratten von einer signifikanten autoradiographisch bestimmten Reduktion der RD [<sup>3</sup>H]-Epibatidin-markierter nAChR im Basalen Vorderhirn, allerdings nicht im Putamen. Auch die RD der mAChR sind dabei im Basalen Vorderhirn, nicht aber im Putamen signifikant reduziert. Allerdings ist der Beobachtungszeitraum in den hier aufgeführten Untersuchungen mit bis zu einundzwanzig Tagen sehr kurz und ein Langzeiteffekt demnach nicht vorher zusagen. Auch wirken die verschiedenen Methoden der Traumatisierung indirekt über die Hirnoberfläche und sind großflächiger verteilt, demnach also nur begrenzt mit einer Stereotaxie vergleichbar. Leider finden sich in der Literatur nach meinem Wissenstand keine weiteren Untersuchungen, welche sich konkret mit den RD des CPu infolge einer mechanischen Läsionierung oder eines operativen Traumas beschäftigen. Donat et al., (2008) kann in seinen Untersuchungen keine Veränderungen der RD im Striatum feststellen. Auch sind die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen noch weitgehend ungeklärt. Auch wenn gemäß den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit 3 Monate nach den stereotaktischen Injektionen nur ein marginaler Unterschied in den relativen RD besteht und der Einfluss auf die RD unwahrscheinlich ist, kann dennoch unter Zusammenschau der hier aufgeführten Arbeiten ein depressiver Effekt operativer Manipulationen auf die Rezeptorverteilung nicht sicher ausgeschlossen werden. Der Beobachtungszeitraum für die Gruppe LV über 3 Monate mit nur 2 aufeinander folgenden Erhebungen von Messwerten sehr kurz. Langzeiteffekt über diesen Zeitraum hinaus sind nicht sicher absehbar und die Beobachtung über eine längere Zeit hinaus war aufgrund begrenzter Ressourcen für diese umfassende Rezeptorbindungsstudie nicht möglich.

## 5. Anhang

### 5.1 Literaturverzeichnis

- Abood, L. G.;** Reynolds, D. T.; Booth, H.; Bidlack, J. M. (1981): Sites and mechanisms for nicotine's action in the brain. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 5 (4), S. 479–486.
- Amenta, F.;** Bernardi, G.; Floris, V.; Marciani, M. G. (1979): Localization of  $\alpha$ -bungarotoxin binding sites within the rat corpus striatum. In: *Neuropharmacology* 18 (3), S. 319–322.
- Antipova, V.;** Hawlitschka, A.; Mix, E.; Schmitt, O.; Drager, D.; Benecke, R.; Wree, A. (2013): Behavioral and structural effects of unilateral intrastriatal injections of botulinum neurotoxin a in the rat model of Parkinson's disease. In: *Journal of neuroscience research* 91 (6), S. 838–847.
- Antipova, V. A.;** Holzmann, C.; Schmitt, O.; Wree, A.; Hawlitschka, A. (2017): Botulinum Neurotoxin A Injected Ipsilaterally or Contralaterally into the Striatum in the Rat 6-OHDA Model of Unilateral Parkinson's Disease Differently Affects Behavior. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 11, S. 119.
- Antonucci, F.;** Rossi, C.; Gianfranceschi, L.; Rossetto, O.; Caleo, M. (2008): Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (14), S. 3689–3696.
- Araki, T.;** Tanji, H.; Fujihara, K.; Kato, H.; Imai, Y.; Mizugaki, M.; Itoyama, Y. (2000): Sequential changes of cholinergic and dopaminergic receptors in brains after 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle in rats. In: *J Neural Transm* 107 (8-9), S. 873–884.
- Araujo, D. M.;** Lapchak, P. A.; Quirion, R. (1991): Heterogeneous binding of 3H4-DAMP to muscarinic cholinergic sites in the rat brain: evidence from membrane binding and autoradiographic studies. In: *Synapse* 9 (3), S. 165–176.
- Aubert, I.;** Rowe, W.; Meaney, M. J.; Gauthier, S.; Quirion, R. (1995): Cholinergic markers in aged cognitively impaired long-evans rats. In: *Neuroscience* 67 (2), S. 277–292.
- Aubert, I.;** Cécyre, D.; Gauthier, S.; Quirion, R. (1992): Characterization and autoradiographic distribution of [3H]AF-DX 384 binding to putative muscarinic M2 receptors in the rat brain. In: *European journal of pharmacology* 217 (2-3), S. 173–184.
- Bauer, A.;** Zilles, K.; Matusch, A.; Holzmann, C.; Riess, O.; Hörsten, S. von (2005): Regional and subtype selective changes of neurotransmitter receptor density in a rat transgenic for the Huntington's disease mutation. In: *Journal of neurochemistry* 94 (3), S. 639–650.
- Bellerocche, J. de.;** Kilpatrick, I. C.; Birdsall, N. J. M.; Hulme, E. C. (1982): Presynaptic muscarinic receptors on dopaminergic terminals in the nucleus accumbens. In: *Brain research* 234 (2), S. 327–337.
- Bellerocche, J. de.;** Lugmani, Y.; Bradford, H. F. (1979): Evidence for presynaptic cholinergic receptors on dopaminergic terminals: Degeneration studies with 6-hydroxydopamine. In: *Neuroscience letters* 11 (2), S. 209–213.
- Berliocchi, L.;** Fava, E.; Leist, M.; Horvat, V.; Dinsdale, D.; Read, D.; Nicotera, P. (2005): Botulinum neurotoxin C initiates two different programs for neurite degeneration and neuronal apoptosis. In: *The Journal of cell biology* 168 (4), S. 607–618.
- Bernard, V.;** Normand, E.; Bloch, B. (1992): Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptor genes. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12 (9), S. 3591–3600.
- Blandini, F.;** Armentero, M.-T. (2012): Animal models of Parkinson's disease. In: *The FEBS journal* 279 (7), S. 1156–1166.
- Blesa, J.;** Phani, S.; Jackson-Lewis, V.; Przedborski, S. (2012): Classic and new animal models of Parkinson's disease. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, S. 845618.
- Blesa, J.;** Przedborski, S. (2014): Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. In: *Frontiers in neuroanatomy* 8, S. 155.
- Bonsi, P.;** Cuomo, D.; Martella, G.; Madeo, G.; Schirinzi, T.; Puglisi, F. et al. (2011): Centrality of striatal cholinergic transmission in Basal Ganglia function. In: *Frontiers in neuroanatomy* 5, S. 6.

- Brann, M. R.; Buckley, N. J.; Bonner, T. I. (1988):** The striatum and cerebral cortex express different muscarinic receptor mRNAs. In: *FEBS letters* 230 (1-2), S. 90–94.
- Brosig, H.:** Botulinum-Neurotoxin A-induzierte Varikositäten im Caudatus putamen der Ratte: eine quantitative Verlaufsstudie. Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock, univ. Diss., Universität Rostock 2014.
- Calabresi, P.; Centonze, D.; Gubellini, P.; Pisani, A.; Bernardi, G. (2000):** Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. In: *Trends in Neurosciences* 23 (3), S. 120–126.
- Charpantier, E.; Barneoud, P.; Moser, P.; Besnard, F.; Sgard, F. (1998):** Nicotinic acetylcholine subunit mRNA expression in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra and ventral tegmental area. In: *Neuroreport* 9 (13), S. 3097–3101.
- Chaudhuri, J. D.; Hiltunen, M.; Nykänen, M.; Ylä-Herttuala, S.; Soininen, H.; Miettinen, R. (2005):** Localization of M2 muscarinic receptor protein in parvalbumin and calretinin containing cells of the adult rat entorhinal cortex using two complementary methods. In: *Neuroscience* 131 (2), S. 557–566.
- Chuang, Y.-C.; Tu, C.-H.; Huang, C.-C.; Lin, H.-J.; Chiang, P.-H.; Yoshimura, N.; Chancellor, M. B. (2006):** Intraprostatic injection of botulinum toxin type-A relieves bladder outlet obstruction in human and induces prostate apoptosis in dogs. In: *BMC urology* 6, S. 12.
- Clarke, P. B.; Pert, C. B.; Pert, A. (1984):** Autoradiographic distribution of nicotine receptors in rat brain. In: *Brain research* 323 (2), S. 390–395.
- Clarke, P. B.; Schwartz, R. D.; Paul, S. M.; Pert, C. B.; Pert, A. (1985):** Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of <sup>3</sup>Hacetylcholine, <sup>3</sup>Hnicotine, and <sup>125</sup>I-alpha-bungarotoxin. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 5 (5), S. 1307–1315.
- Clarke, P. B.S.; Pert, A. (1985):** Autoradiographic evidence for nicotine receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic neurons. In: *Brain research* 348 (2), S. 355–358.
- Cortes, R.; Palacios, J. M. (1986):** Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the rat brain. I. Quantitative autoradiographic studies. In: *Brain research* 362 (2), S. 227–238.
- Costa, L. G.; Murphy, S. D. (1983):** <sup>3</sup>HNicotine binding in rat brain: alteration after chronic acetylcholinesterase inhibition. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 226 (2), S. 392–397.
- Cross, A. J.; Waddington, J. L. (1980):** [<sup>3</sup>H]quinuclidinyl benzylate and [<sup>3</sup>H]GABA receptor binding in rat substantia nigra after 6-hydroxy-dopamine lesions. In: *Neuroscience letters* 17 (3), S. 271–275.
- da Silva, L. B.; Poulsen, J. N.; Arendt-Nielsen, L.; Gazerani, P. (2015):** Botulinum neurotoxin type A modulates vesicular release of glutamate from satellite glial cells. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 19 (8), S. 1900–1909. DOI: 10.1111/jcmm.12562.
- Davies, A. R. L.; Hardick, D. J.; Blagbrough, I. S.; Potter, B. V. L.; Wolstenholme, A. J.; Wonnacott, S. (1999):** Characterisation of the binding of [<sup>3</sup>H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling  $\alpha$ 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. In: *Neuropharmacology* 38 (5), S. 679–690.
- Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; Gage, F. H.; Fisher, L. J.; Hunt, M. A.; Wamsley, J. K. (1991):** Downregulation of muscarinic receptors in the rat caudate-putamen after lesioning of the ipsilateral nigrostriatal dopamine pathway with 6-hydroxydopamine (6-OHDA): normalization by fetal mesencephalic transplants. In: *Brain research* 540 (1-2), S. 145–152.
- Dawson, T. M.; Dawson, V.L.; Gage, F. H.; Fisher, L. J.; Hunt, M. A.; Wamsley, J. K. (1991):** Downregulation of muscarinic receptors in the rat caudate-putamen after lesioning of the ipsilateral nigrostriatal dopamine pathway with 6-hydroxydopamine (6-OHDA): normalization by fetal mesencephalic transplants. In: *Brain research* 540 (1-2), S. 145–152.
- de Belleruche, J S; Winn, P.; Murzi, E.; Williams, S. F.; Herberg, L. J. (1982):** Presynaptic modulation of dopamine-induced locomotor activity of oxotremorine in nucleus accumbens of the rat. In: *Journal of neural transmission* 54 (3-4), S. 134–143.
- DeAngelis, M. M.; Hayes, R. L.; Lyeth, B. G. (1994):** Traumatic brain injury causes a decrease in M2 muscarinic cholinergic receptor binding in the rat brain. In: *Brain research* 653 (1-2), S. 39–44.
- DeBoer, P.; Abercrombie, E. D.; Heeringa, M.; Westerink, B. H. (1993):** Differential effect of systemic administration of bromocriptine and L-dopa on the release of acetylcholine from striatum of intact and 6-OHDA-treated rats. In: *Brain research* 608 (2), S. 198–203.

- Donat, C. K.;** Schuhmann, M.U.; Voigt, C.; Nieber, K.; Deuther-Conrad, W.; Brust, P. (2008): Time-dependent alterations of cholinergic markers after experimental traumatic brain injury. In: *Brain research* 1246, S. 167–177.
- Elliott, K. J.;** Jones, J. M.; Sacaan, A. I.; Lloyd, G. K.; Corey-Naeve, J. (1998): 6-hydroxydopamine lesion of rat nigrostriatal dopaminergic neurons differentially affects nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA expression. In: *Journal of molecular neuroscience : MN* 10 (3), S. 251–260.
- Ferrari, R.;** Pedrazzi, P.; Algeri, S.; Agnati, L. F.; Zoli, M. (1999): Subunit and region-specific decreases in nicotinic acetylcholine receptor mRNA in the aged rat brain. In: *Neurobiology of aging* 20 (1), S. 37–46.
- Forsayeth, J. R.;** Kobrin, E. (1997): Formation of Oligomers Containing the  $\beta$ 3 and  $\beta$ 4 Subunits of the Rat Nicotinic Receptor. In: *J. Neurosci.* 17 (5), S. 1531.
- Fortin, G. D.;** Desrosiers, C. C.; Yamaguchi, N.; Trudeau, L.-E. (2006): Basal somatodendritic dopamine release requires snare proteins. In: *Journal of neurochemistry* 96 (6), S. 1740–1749.
- Frick, C. G.;** Richtsfeld, Martina; Sahani, N. D.; Kaneki, M.; Blobner, M.; Martyn, J. A. J. (2007): Long-term effects of botulinum toxin on neuromuscular function. In: *Anesthesiology* 106 (6), S. 1139–1146.
- Fryer, A. D.;** Christopoulos, A.; Nathanson, N. M. (2012): Muscarinic receptors. In: *Hofmann, F. B. [u.a.] (Hg.): Handbook of Experimental Pharmacology. Volume 208.* München [u.a.]: Springer.
- Garção, P.;** Oliveira, C. R.; Cunha, R. A.; Agostinho, P. (2014): Subsynaptic localization of nicotinic acetylcholine receptor subunits: a comparative study in the mouse and rat striatum. In: *Neuroscience letters* 566, S. 106–110.
- Garcia-Munoz, M.;** Patino, P.; Young, S. J.; Groves, P. M. (1996): Effects of nicotine on dopaminergic nigrostriatal axons requires stimulation of presynaptic glutamatergic receptors. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 277 (3), S. 1685–1693.
- Garcia-Munoz, M.;** Patino, P.; Young, S. J.; Groves, P. M. (1996): Effects of nicotine on dopaminergic nigrostriatal axons requires stimulation of presynaptic glutamatergic receptors. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 277 (3), S. 1685–1693.
- Gerfen, C. R.** (2004): Basal Ganglia. In: *Paxinos, G. (Hg.): The Rat Nervous System.* Third Edition. Burlington: Academic Press, S. 455–508.
- Gerlach, M.;** Reichmann, H.; Riederer, P. (Hg.) (2007): Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie. 4., überarb. und erw. Aufl., Wien [u.a.]: Springer.
- Gorgal, Tiago;** Charrua, Ana; Silva, João F.; Avelino, António; Dinis, Paulo; Cruz, Francisco (2012): Expression of apoptosis-regulating genes in the rat prostate following botulinum toxin type A injection. In: *BMC urology* 12, S. 1.
- Gotti, C.;** Clementi, F.; Fornari, A.; Gaimarri, A.; Guiducci, S.; Manfredi, I. et al. (2009): Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. In: *Biochemical pharmacology* 78 (7), S. 703–711.
- Gotti, C.;** Moretti, M.; Gaimarri, A.; Zanardi, A.; Clementi, F.; Zoli, M. (2007): Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. In: *Biochemical pharmacology* 74 (8), S. 1102–1111.
- Grady, S. R.;** Salminen, O.; Laverty, D. C.; Whiteaker, P.; McIntosh, J. M.; Collins, A. C.; Marks, M. J. (2007): The subtypes of nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic terminals of mouse striatum. In: *Biochemical pharmacology* 74 (8), S. 1235–1246.
- Gurwitz, D.;** Kloog, Y.; Egozi, Y.; Sokolovsky, M. (1979): Central muscarinic receptor degeneration following 6-hydroxydopamine lesion in mice. In: *Life Sciences* 26 (1), S. 79–84.
- Haber, S. N.;** Watson, S. J. (1983): The comparison between enkephalin-like and dynorphin-like immunoreactivity in both monkey and human globus pallidus and substantia nigra. In: *Life Sciences* 33 Suppl 1, S. 33–36.
- Haga, T.** (2013): Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 89 (6), S. 226–256.
- Haghir, H.;** Kovac, S.; Speckmann, E-J; Zilles, K.; Gorji, A. (2009): Patterns of neurotransmitter receptor distributions following cortical spreading depression. In: *Neuroscience* 163 (4), S. 1340–1352.
- Harrison, M. B.;** Tissot, M.; Wiley, R. G. (1996): Expression of m1 and m4 muscarinic receptor mRNA in the striatum following a selective lesion of striatonigral neurons. In: *Brain research* 734 (1-2), S. 323–326.

- Hawlitschka**, A.: Intrastriatale Botulinum-Neurotoxin-A-Applikation im Hemiparkinson-Modell der Ratte - Funktionelle und morphologische Untersuchungen. Dissertation Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock, univ. Diss., Universität Rostock 2012.
- Hawlitschka**, A.; Antipova, V.; Schmitt, O.; Witt, M.; Benecke, R.; Mix, E.; Wree, A. (2013): Intracerebrally applied botulinum neurotoxin in experimental neuroscience. In: *Current pharmaceutical biotechnology* 14 (1), S. 124–130.
- 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. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14 (5 Pt 2), S. 3351–3363.
- Hersch**, S. M.; Levey, A. I. (1995): Diverse pre- and post-synaptic expression of m1–m4 muscarinic receptor proteins in neurons and afferents in the rat neostriatum. In: *Life Sciences* 56 (11-12), S. 931–938.
- Hsu**, K. S.; Yang, C. H.; Huang, C. C.; Gean, P. W. (1996): Carbachol induces inward current in neostriatal neurons through M1-like muscarinic receptors. In: *Neuroscience* 73 (3), S. 751–760.
- Hulme**, E. C.; Lu, Z. L.; Saldanha, J. W.; Bee, M. S. (2003): Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Biochemical Society transactions* 31 (Pt 1), S. 29–34.
- Jiang**, J. Y.; Lyeth, B. G.; Delahunty, T. M.; Phillips, L. L.; Hamm, R. J. (1994): Muscarinic cholinergic receptor binding in rat brain at 15 days following traumatic brain injury. In: *Brain research* 651 (1-2), S. 123–128.
- Jones**, C.K.; Byun N.; Bubser, M. (2012): Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia. In: *Neuropsychopharmacology* 37(1), S. 16-42.
- Jones**, I. W., Bolam, J. P., & Wonnacott, S. (2001): Presynaptic localisation of the nicotinic acetylcholine receptor  $\beta 2$  subunit immunoreactivity in rat nigrostriatal dopaminergic neurones. In: *Journal of Comparative Neurology* 439 (2), S. 235–247.
- Joyce**, J. N. (1991)a: Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine. I. Effects of Intranigral or Intracerebroventricular 6-Hydroxydopamine Lesion of the Mesostriatal Dopamine System. In: *Experimental neurology* 113 (3), S. 261–276.
- Joyce**, J. N. (1991)b: Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine. II. Effects of 6-Hydroxydopamine or Colchicine Microinjections into VTA or Reserpine Treatment. In: *Experimental neurology* 113 (3), S. 277–290.
- Kato**, G.; Carson, S.; Kemel, M. L.; Glowinski, J.; Giorguieff, M. F. (1978): Changes in striatal specific 3-H-atropine binding after unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurones. In: *Life Sciences* 22 (18), S. 1607–1614.
- Klippel**, N.de; Sarre, S.; Ebinger, G.; Michotte, Y.(1993): Effect of M1- and M2-muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism: an in vivo microdialysis study comparing normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. In: *Brain research* 630 (1), S. 57–64.
- Knol**, R. J J; Bruin, K. de; Opmeer, B.; Voorn, P.; Jonker, A. J.; van Eck-Smit, B. L F; Booij, J. (2014): Decreased ipsilateral [ $^{123}$ I]iododexetimide binding to cortical muscarinic receptors in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats. In: *Nuclear medicine and biology* 41 (1), S. 90–95.
- Koos**, Tibor; Tepper, James M. (2002): Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (2), S. 529–535.
- Koos**, T.; Tepper, J. M. (2002): Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (2), S. 529–535.
- Kreitzer**, Anatol C. (2009): Physiology and pharmacology of striatal neurons. In: *Annual review of neuroscience* 32, S. 127–147.
- Le Novere**, N.; Zoli, M.; Changeux, J. P. (1996): Neuronal nicotinic receptor alpha 6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. In: *The European journal of neuroscience* 8 (11), S. 2428–2439.
- Levey**, A. I.; Edmunds, S. M.; Heilman, C. J.; Desmond, T. J.; Frey, K. A. (1994): Localization of muscarinic m3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. In: *Neuroscience* 63 (1), S. 207–221.

- 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. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (5 Pt 2), S. 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. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11 (10), S. 3218–3226.
- Lin, J.Y.;** Chung, K. K H; Castro, D. de; Funk, G. D.; Lipski, J. (2004): Effects of muscarinic acetylcholine receptor activation on membrane currents and intracellular messengers in medium spiny neurones of the rat striatum. In: *The European journal of neuroscience* 20 (5), S. 1219–1230.
- Linseman, D. A.;** Hofmann, F.; Fisher, S. K. (2000): A role for the small molecular weight GTPases, Rho and Cdc42, in muscarinic receptor signaling to focal adhesion kinase. In: *Journal of neurochemistry* 74 (5), S. 2010–2020.
- Liskowsky, D. R.;** Potter, L. T. (1985): Muscarine-binding sites localized to cortical dopamine terminals. In: *Neuroscience letters* 58 (2), S. 229–233.
- Ma, J.;** Shen, J.; Lee, C. A.; Elsaïdi, G.A.; Smith, T. L.; Walker, F. O. et al. (2005): Gene expression of nAChR, SNAP-25 and GAP-43 in skeletal muscles following botulinum toxin A injection: a study in rats. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 23 (2), S. 302–309.
- McClure-Begley, T. D.;** King, N. M.; Collins, A. C.; Stitzel, J.A.; Wehner, J. M.; Butt, C.M. (2009): Acetylcholine-stimulated 3HGABA release from mouse brain synaptosomes is modulated by alpha4beta2 and alpha4alpha5beta2 nicotinic receptor subtypes. In: *Molecular pharmacology* 75 (4), S. 918–926.
- McDonald, A. J.;** Mascagni, F. (2010): Neuronal localization of m1 muscarinic receptor immunoreactivity in the rat basolateral amygdala. In: *Brain structure & function* 215 (1), S. 37–48.
- Mehlan, J.;** Brosig, H.; Schmitt, O.; Mix, E.; Wree, A.; Hawlitschka, A.(2016): Intra-striatal injection of botulinum neurotoxin-A is not cytotoxic in rat brain - A histological and stereological analysis. In: *Brain research* 1630, S. 18–24.
- Michel, P. P.;** Hirsch, E. C.; Hunot, S.(2016): Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. In: *Neuron* 90 (4), S. 675–691.
- More, S. V.;** Kumar, H.; Cho, D.-Y.; Yun, Y.-S.; Choi, D.-K. (2016): Toxin-Induced Experimental Models of Learning and Memory Impairment. In: *International journal of molecular sciences* 17 (9).
- Morin, N.;** Jourdain, V. A.; Di Paolo, T. (2014): Modeling dyskinesia in animal models of Parkinson disease. In: *Experimental neurology* 256, S. 105–116.
- Morris, J. L.;** Jobling, P.; Gibbins, I. L. (2002): Botulinum neurotoxin A attenuates release of norepinephrine but not NPY from vasoconstrictor neurons. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 283 (6), S. H2627-35
- Muccioli, G.;** Raso, Giuseppina M.; Ghé, C.; Di Carlo, R. (1996): Effect of L- $\alpha$ -glycerylphosphorylcholine on muscarinic receptors and membrane microviscosity of aged rat brain. In: *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 20 (2), S. 323–339.
- Niittykoski, M.;** Ruotsalainen, S.; Haapalinna, A.; Larson, J.; Sirviö, J. (1999): Activation of muscarinic M3-like receptors and  $\beta$ -adrenoceptors, but not M2-like muscarinic receptors or  $\alpha$ -adrenoceptors, directly modulates corticostriatal neurotransmission in vitro. In: *Neuroscience* 90 (1), S. 95–105.
- Nomura, Y.;** Kajiyama, H.; Nakata, Y.; Segawa, T. (1979): Muscarinic cholinergic binding in striatal and mesolimbic areas of the rat: reduction by 6-hydroxydopa. In: *European journal of pharmacology* 58 (2), S. 125–131.
- Obeso, J. A.;** Marin, C.; Rodriguez-Oroz, M. C.; Blesa, J.; Benitez-Temino, B.; Mena-Segovia, J. (2008): The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. In: *Annals of neurology* 64 Suppl 2, S. S30-46.
- Obeso, J. A.;** Rodriguez-Oroz, M. C.; Benitez-Temino, B.; Blesa, F. J.; Guridi, J.; Marin, C.; Rodriguez, M. (2008): Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 23 Suppl 3, S. S548-59.
- Oldenburg, I. A.;** Ding, J. B. (2011): Cholinergic modulation of synaptic integration and dendritic excitability in the striatum. In: *Current opinion in neurobiology* 21 (3), S. 425–432.

- Palomero-Gallagher**, N.; Schleicher, A.; Lindemann, S.; Lessenich, A.; Zilles, K.; Löscher, W. (2008): Receptor fingerprinting the circling ci2 rat mutant: insights into brain asymmetry and motor control. In: *Experimental neurology* 210 (2), S. 624–637.
- Paxinos**, G.; Watson, C. (Hg.) (2007): *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sixth Edition. Australia: Academic Press.
- Peck**, M. W.; Smith, T. J.; Anniballi, F.; Austin, J. W.; Bano, L.; Bradshaw, M. (2017): Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. In: *Toxins* 9 (1).
- Perez**, X. A.; Bordia, T.; McIntosh, J. M.; Quik, M. (2010):  $\alpha 6\beta 2^*$  and  $\alpha 4\beta 2^*$  nicotinic receptors both regulate dopamine signaling with increased nigrostriatal damage: relevance to Parkinson's disease. In: *Molecular pharmacology* 78 (5), S. 971–980.
- Perez-Burgos**, A.; Perez-Rosello, T.; Salgado, H.; Flores-Barrera, E.; Prieto, G. A.; Figueroa, A. et al. (2008): Muscarinic M(1) modulation of N and L types of calcium channels is mediated by protein kinase C in neostriatal neurons. In: *Neuroscience* 155 (4), S. 1079–1097.
- Perry**, D. C.; Kellar, K. J. (1995): 3Hepibatidine labels nicotinic receptors in rat brain: an autoradiographic study. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 275 (2), S. 1030–1034.
- Piggott**, M.; Owens, J.; O'Brien, J.; Paling, S.; Wyper, D.; Fenwick, J. et al. (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. In: *Journal of Chemical Neuroanatomy* 24 (3), S. 211–223.
- Pirazzini**, M.; Rossetto, O.; Eleopra, R.; Montecucco, C. (2017): Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. In: *Pharmacological reviews* 69 (2), S. 200–235.
- Poulin**, B.; Butcher, A.; McWilliams, P.; Bourgognon, J.-M.; Pawlak, R.; Kong, K. C. (2010): The M3-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (20), S. 9440–9445.
- Rakovska**, A.; Javitt, D.; Raichev, P.; Ang, R.; Balla, A.; Aspromonte, J.; Sylvester Vizi, E. (2003): Physiological release of striatal acetylcholine (in vivo): effect of somatostatin on dopaminergic–cholinergic interaction. In: *Brain Research Bulletin* 61 (5), S. 529–536.
- Reisine**, T. D.; Nagy, J. I.; Beaumont, K.; Fibiger, H. C.; Yamamura, H. I. (1979): The localization of receptor binding sites in the substantia nigra and striatum of the rat. In: *Brain research* 177 (2), S. 241–252.
- Rogozinska**, K.; Skangiel-Kramska, J. (2010): Effect of focal cerebral ischaemia on modulatory neurotransmitter receptors in the rat brain: an autoradiographic study. In: *Journal of Chemical Neuroanatomy* 40 (3), S. 232–238.
- Rossetto**, O.; Pirazzini, M.; Montecucco, C. (2014): Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. In: *Nature reviews. Microbiology* 12 (8), S. 535–549.
- Rouse**, S. T.; Levey, A. I. (1996): Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity in septohippocampal neurons and other identified hippocampal afferents. In: *The Journal of comparative neurology* 375 (3), S. 406–416.
- Rover**, M. de; Lodder, J. C.; Kits, K. S.; Schoffemeer, A. N. M.; Brussaard, A. B. (2002): Cholinergic modulation of nucleus accumbens medium spiny neurons. In: *The European journal of neuroscience* 16 (12), S. 2279–2290.
- Sandor**, N. T.; Zelles, T.; Kiss, J.; Sershen, H.; Torocsik, A.; Lajtha, A.; Sylvester Vizi, E. (1991): Effect of nicotine on dopaminergic–cholinergic interaction in the striatum. In: *Brain research* 567 (2), S. 313–316.
- Schmaljohann**, J.; Gündisch, D.; Minnerop, M.; Bucerius, J.; Joe, A.; Reinhardt, M. (2006): In vitro evaluation of nicotinic acetylcholine receptors with 2-[18F]F-A85380 in Parkinson's disease. In: *Nuclear medicine and biology* 33 (3), S. 305–309.
- Schmidt**, M.; Rumenapp, U.; Bienek, C.; Keller, J.; Eichel-Streiber, C. von; Jakobs, K. H. (1996): Inhibition of receptor signaling to phospholipase D by Clostridium difficile toxin B. Role of Rho proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (5), S. 2422–2426.
- Schwartz**, R. D.; Lehmann, J.; Kellar, K. J. (1984): Presynaptic nicotinic cholinergic receptors labeled by 3Hacetylcholine on catecholamine and serotonin axons in brain. In: *Journal of neurochemistry* 42 (5), S. 1495–1498.

- Shan, X.-F.; Xu, H.; Cai, Z.-G.; Wu, L.-L.; Yu, G.-Y. (2013):** Botulinum toxin A inhibits salivary secretion of rabbit submandibular gland. In: *International journal of oral science* 5 (4), S. 217–223.
- Shen, J.; Ma, J.; Lee, C.; Smith, B. P.; Smith, T. L.; Tan, K. H.; Koman, L. A. (2006):** How muscles recover from paresis and atrophy after intramuscular injection of botulinum toxin A: Study in juvenile rats. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 24 (5), S. 1128–1135.
- Sorenson, E. M.; Shiroyama, T.; Kitai, S. T. (1998):** Postsynaptic nicotinic receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta of the rat. In: *Neuroscience* 87 (3), S. 659–673.
- Spehlmann, R.; Stahl, S. M. (1976):** Dopamine acetylcholine imbalance in Parkinson's disease. Possible regenerative overgrowth of cholinergic axon terminals. In: *Lancet (London, England)* 1 (7962), S. 724–726.
- Spencer, D G Jr; Horvath, E.; Traber, J. (1986):** Direct autoradiographic determination of M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor distribution in the rat brain: relation to cholinergic nuclei and projections. In: *Brain research* 380 (1), S. 59–68.
- Stewart, M.G. (Hg.) (1992):** Quantitative Methods in Neuroanatomy. Chichester [u.a.]: John Wiley & Sons.
- Strumpf, W. E., Solomon, H.F. (Hg) (1995):** Autoradiography and Correlative Imaging. San Diego [u.a.]: Academic Press.
- Suga, M. (1980):** Effect of long-term L-dopa administration on the dopaminergic and cholinergic (muscarinic) receptors of striatum in 6-hydroxydopamine lesioned rats. In: *Life Sciences* 27 (10), S. 877–882.
- Tribollet, E.; Bertrand, D.; Marguerat, A.; Raggenbass, M. (2004):** Comparative distribution of nicotinic receptor subtypes during development, adulthood and aging: an autoradiographic study in the rat brain. In: *Neuroscience* 124 (2), S. 405–420.
- Ungerstedt, U. (1968):** 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. In: *European journal of pharmacology* 5 (1), S. 107–110.
- Verbois, S. L.; Scheff S.W.; Pauly, J. R. (2003):** Time-Dependent Changes in Rat Brain Cholinergic Receptor Expression after Experimental Brain Injury. In: *Neuropharmacology* 44(2), S. 224–33.
- Visanji, N. P.; Mitchell, S. N.; O'Neill, M. J.; Duty, S. (2006):** Chronic pre-treatment with nicotine enhances nicotine-evoked striatal dopamine release and alpha6 and beta3 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA in the substantia nigra pars compacta of the rat. In: *Neuropharmacology* 50 (1), S. 36–46.
- Wang, Q.; Wei, X.; Gao, H.; Li, J.; Liao, J.; Liu, X. et al. (2014):** Simvastatin reverses the downregulation of M1/4 receptor binding in 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats: the association with improvements in long-term memory. In: *Neuroscience* 267, S. 57–66.
- Wedekind, F.; Oskamp, A.; Lang, M.; Hawlitschka, A.; Zilles, K.; Wree, A.; Bauer A. (2017):** Intra-striatal administration of botulinum neurotoxin A normalizes striatal D2 R binding and reduces D1 R binding in male hemiparkinsonian rats. In: *Journal of Neuroscience Research*. DOI: 10.1002/jnr.24110.
- Weiner, D. M., Levey, A. I., & Brann, M. R. (1990):** Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (87(18)), S. 7050–7054.
- Wilson, C. J. (2009):** Striatum: Internal Physiology. In: *Squire L. R. (Hg.): Encyclopedia of Neuroscience*. London: Elsevier Ltd. Academic Press. S. 563-572.
- Wonnacott, S.; Kaiser, S.; Mogg, A.; Soliakov, L.; Jones, I. W. (2000):** Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. In: *European journal of pharmacology* 393 (1-3), S. 51–58.
- Wree, A.; Mix, E.; Hawlitschka, A.; Antipova, V.; Witt, M.; Schmitt, O.; Benecke, R. (2011):** Intra-striatal botulinum toxin abolishes pathologic rotational behaviour and induces axonal varicosities in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. In: *Neurobiology of disease* 41 (2), S. 291–298.
- Yan, Z.; Flores-Hernandez, J.; Surmeier, D.J (2001):** Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. In: *Neuroscience* 103 (4), S. 1017–1024.
- Yan, Z.; Surmeier, D. J. (1996):** Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (8), S. 2592–2604.
- Zhou, F.-M.; Wilson, C. J.; Dani, J. A. (2002):** Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. In: *J Neurobiol* 53 (4), S. 590–605.

Zilles, K.; Tillmann, B.N. (Hg.) (2010): Anatomie. 1. Aufl. Heidelberg: Springer.

Zoli, M., Moretti, M., Zanardi, A., McIntosh, J. M., Clementi, F., & Gotti, C. (2002): Identification of the Nicotinic Receptor Subtypes Expressed on Dopaminergic Terminals in the Rat Striatum. In: *The Journal of neuroscience* (22(20)), S. 8785–8789.

## 5.2 Internetverzeichnis

Gaidica, Matt: Rat Brain Atlas. <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/> (zuletzt aufgerufen am 24.08.2017).

## 5.3 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1: Koordinaten der stereotaktischen Injektion simuliert am Computermodell des Rattenhirns.** (modifiziert übernommen aus Hawlitschka, A.: Intrastriatale Botulinum-Neurotoxin-A-Applikation im Hemiparkinson-Modell der Ratte - Funktionelle und morphologische Untersuchungen. Dissertation Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock, univ. Diss., Universität Rostock 2012)

**Abbildung 2: Schnittebene 1.** (modifiziert übernommen gem. Paxinos und Watson, 2006 aus: Gaidica, Matt: Rat Brain Atlas. <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/>)

**Abbildung 3: Schnittebene 2.** (modifiziert übernommen gem. Paxinos und Watson, 2006 aus: Gaidica, Matt: Rat Brain Atlas. <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/>)

**Abbildung 4: Schnittebene 3.** (modifiziert übernommen gem. Paxinos und Watson, 2006 aus: Gaidica, Matt: Rat Brain Atlas. <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/>)

**Abbildung 5: Schnittebene 4.** (modifiziert übernommen gem. Paxinos und Watson, 2006 aus: Gaidica, Matt: Rat Brain Atlas. <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/>)

**Abbildung 6: Schnittebene 5.** (modifiziert übernommen gem. Paxinos und Watson, 2006 aus: Gaidica, Matt: Rat Brain Atlas. <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/>)

**Abbildung 7: Schnittebene 6.** (modifiziert übernommen gem. Paxinos und Watson, 2006 aus: Gaidica, Matt: Rat Brain Atlas. <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/>)

**Abbildung 8: Schnittebene 7.** (modifiziert übernommen gem. Paxinos und Watson, 2006 aus: Gaidica, Matt: Rat Brain Atlas. <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/>)

**Abbildung 9: Kalibrierungskurve der vordefinierten Standards** (Screenshot aus MCID™ Analysis Version 7.0, InterFocus Imaging LTD, Linton, GB)

**Abbildung 10: Ergebnistabelle mit den CD eines Tieres für den Liganden AF-DX 384.** (Screenshot aus MCID™ Analysis Version 7.0, InterFocus Imaging LTD, Linton, GB)

**Abbildung 11: Autoradiogramm eines Hirnschnittes auf Schnittebene 1 vor der Bearbeitung in MCID™** (Screenshot aus MCID™ Analysis Version 7.0, InterFocus Imaging LTD, Linton, GB)

**Abbildung 12: Autoradiogramm eines Hirnschnittes auf Schnittebene 1 nach der Bearbeitung in MCID™** (Screenshot aus MCID™ Analysis Version 7.0, InterFocus Imaging LTD, Linton, GB)

**Abbildung 13: Autoradiogramm eines Hirnschnittes auf Schnittebene 1 vor der Bearbeitung in MCID™ mit Artefakten im Messbereich.** (Screenshot aus MCID™ Analysis Version 7.0, InterFocus Imaging LTD, Linton, GB)

**Abbildung 14: Autoradiogramm eines Hirnschnittes auf Schnittebene 1 nach der Bearbeitung in MCID™ mit Artefakten außerhalb des Messbereichs.** (Screenshot aus MCID™ Analysis Version 7.0, InterFocus Imaging LTD, Linton, GB)

## 5.4 Tabellenverzeichnis

**Tabelle 11: Ergebnisse nAChR – [<sup>3</sup>H]Epibatidin.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu in [fmol/mg Protein]. SD area RD L: Standardabweichung area-gewichteten mittleren Rezeptordichte linkes CPu. MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu in [fmol/mg Protein]. SD area RD R: Standardabweichung area-gewichteten mittleren Rezeptordichte rechtes CPu. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

### nAChR - [<sup>3</sup>H]Epibatidin

Untergruppen	MW area RD L	SD area RD L	MW area RD R	SD area RD R
K	392	35	382	23
L3W	354	23	148	18
L6W	314	36	146	28
L6W1M	325	25	145	22
L6W3M	285	20	120	16
L6W6M	305	16	135	13
L6W9M	314	32	122	22
B2W	367	23	399	22
B1M	385	28	415	35
B3M	280	18	312	22
B6M	317	23	317	17
B9M	324	22	325	16
LB6W1M	396	50	234	38
LB6W3M	295	21	140	18
LB6W6M	325	32	173	11
LB6W9M	306	21	152	23
LV6W1M	316	21	155	23
LV6W3M	302	20	115	13

**Tabelle 12: Ergebnisse mAChR M<sub>1</sub> – [<sup>3</sup>H]Pirenzepin.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu in [fmol/mg Protein]. SD area RD L: Standardabweichung area-gewichteten mittleren Rezeptordichte linkes CPu. MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu in [fmol/mg Protein]. SD area RD R: Standardabweichung area-gewichteten mittleren Rezeptordichte rechtes CPu. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

### mAChR M<sub>1</sub> - [<sup>3</sup>H]Pirenzepin

Untergruppen	MW area RD L	SD area RD L	MW area RD R	SD area RD R
K	5149,24	2335,46	5035,26	2327,61
L3W	6082,50	733,29	5398,68	630,57
L6W	6775,35	1772,35	6097,42	1647,71
L6W1M	4613,19	1588,59	4027,76	1563,53
L6W3M	6447,33	1479,76	5840,55	1341,82
L6W6M	3719,55	716,12	3521,70	715,55
L6W9M	3937,35	849,81	3745,37	686,20
B2W	5736,81	1775,82	5368,12	1852,95
B1M	5061,47	1216,36	4802,40	1167,80
B3M	4609,03	1206,71	4597,55	1211,41
B6M	4715,72	1516,23	4820,23	1497,83
B9M	5528,98	1374,67	5825,26	1485,99
LB6W1M	4244,65	1188,77	3938,41	1179,59
LB6W3M	4785,91	1139,34	4632,74	1136,91
LB6W6M	5850,67	1283,07	5741,80	1314,32
LB6W9M	5410,70	1700,65	5306,58	1520,07
LV6W1M	4034,20	1256,57	3768,91	1037,00
LV6W3M	4502,69	1924,83	4147,67	1797,26

**Tabelle 13: Ergebnisse mAChR M<sub>2</sub> – [<sup>3</sup>H]Oxotremorin.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu in [fmol/mg Protein]. SD area RD L: Standardabweichung area-gewichteten mittleren Rezeptordichte linkes CPu. MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu in [fmol/mg Protein]. SD area RD R: Standardabweichung area-gewichteten mittleren Rezeptordichte rechtes CPu. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

### mAChR M<sub>2</sub> - [<sup>3</sup>H]Oxotremorin

Untergruppen	MW area RD L	SD area RD L	MW area RD R	SD area RD R
K	924	82	974	109
L3W	931	78	922	75
L6W	988	71	1010	109
L6W1M	1038	68	900	49
L6W3M	924	61	869	96
L6W6M	928	61	864	51
L6W9M	819	82	758	80
B2W	764	62	703	75
B1M	1017	129	874	102,17
B3M	1121	101	1112	73
B6M	1174	83	1205	93
B9M	751	65	847	69
LB6W1M	1121	78	1016	96
LB6W3M	759	80	709	44
LB6W6M	996	102	995	90
LB6W9M	1035	80	1025	105
LV6W1M	816	40	798	48
LV6W3M	908	103	858	114

**Tabelle 14: Ergebnisse mAChR M<sub>2</sub> – [<sup>3</sup>H]AF-DX 384.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu in [fmol/mg Protein]. SD area RD L: Standardabweichung area-gewichteten mittleren Rezeptordichte linkes CPu. MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu in [fmol/mg Protein]. SD area RD R: Standardabweichung area-gewichteten mittleren Rezeptordichte rechtes CPu. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

### mAChR M<sub>2</sub> - [<sup>3</sup>H]AF-DX 384

Untergruppen	MW area RD L	SD area RD L	MW area RD R	SD area RD R
K	3894	363	3859	352
L3W	4031	213	3579	195
L6W	3335	262	2782	269
L6W1M	3680	112	2991	208
L6W3M	2745	280	2317	237
L6W6M	3369	132	2814	225
L6W9M	3271	140	2778	171
B2W	4235	332	3582	387
B1M	3423	105	3047	192
B3M	3304	149	2990	227
B6M	2816	157	2800	207
B9M	2906	242	3006	256
LB6W1M	3165	222	2533	231
LB6W3M	3037	284	2539	267
LB6W6M	3156	202	2842	302
LB6W9M	2631	155	2466	285
LV6W1M	3158	244	2728	386
LV6W3M	3237	114	2746	121

**Tabelle 15: Ergebnisse mAChR M<sub>3</sub> – [<sup>3</sup>H]4-DAMP.** MW area RD L: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte linkes CPu in [fmol/mg Protein]. SD area RD L: Standardabweichung area-gewichteten mittleren Rezeptordichte linkes CPu. MW area RD R: Mittelwert der area-gewichteten Rezeptordichte rechtes CPu in [fmol/mg Protein]. SD area RD R: Standardabweichung area-gewichteten mittleren Rezeptordichte rechtes CPu. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

**mAChR M<sub>3</sub> - [<sup>3</sup>H]4-DAMP**

<b>Untergruppen</b>	<b>MW area RD L</b>	<b>SD area RD L</b>	<b>MW area RD R</b>	<b>SD area RD R</b>
<b>K</b>	7274	709	7368	757
<b>L3W</b>	4882	385	4623	305
<b>L6W</b>	4447	401	4357	366
<b>L6W1M</b>	5621	433	5133	463
<b>L6W3M</b>	4697	519	4378	472
<b>L6W6M</b>	5311	516	5027	515
<b>L6W9M</b>	5032	259	4784	379
<b>B2W</b>	5811	845	5625	831
<b>B1M</b>	4562	461	4548	212
<b>B3M</b>	5231	379	5114	292
<b>B6M</b>	5453	450	5677	409
<b>B9M</b>	5935	569	6401	685
<b>LB6W1M</b>	4401	541	4113	462
<b>LB6W3M</b>	4795	542	4560	612
<b>LB6W6M</b>	4884	653	4880	641
<b>LB6W9M</b>	5332	552	5346	735
<b>LV6W1M</b>	5140	830	5181	838
<b>LV6W3M</b>	5492	716	5298	651

**Tabelle 16: Relative RD der einzelnen Tiere jeder Untergruppe der nAChR-[<sup>3</sup>H]Epibatidin.** Jede Untergruppenbezeichnung steht für ein Tier aus der jeweiligen Gruppe. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

nAChR-[<sup>3</sup>H]Epibatidin

Gruppe	Untergruppe	relative RD
K	K	0,31
	K	-17,98
	K	1,46
	K	4,74
	K	0,19
	K	-1,1
	K	-0,97

Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD
L	L3W	-62,54	L6W 1M	-59,6	L6W 6M	-56,01
	L3W	-60,51	L6W 1M	-57,02	L6W 6M	-55,53
	L3W	-59,79	L6W 1M	-58,25	L6W 6M	-57,9
	L3W	-54,18	L6W 1M	-48,8	L6W 6M	-54,76
	L3W	-56,3	L6W 1M	-53,84	L6W 6M	-51,54
	L3W	-55,36	L6W 1M	-51,38	L6W 6M	-60,58
	L3W	-60,53	L6W 1M	-59,9	L6W 6M	-55,48
	L6W	-59,23	L6W 3M	-53,75	L6W 9M	-53,42
	L6W	-59,24	L6W 3M	-59,92	L6W 9M	-63,22
	L6W	-58,24	L6W 3M	-51,44	L6W 9M	-64,06
	L6W	-47,77	L6W 3M	-51,73	L6W 9M	-60,7
	L6W	-52,75	L6W 3M	-64,86	L6W 9M	-67,4
	L6W	-48,97	L6W 3M	-57,11	L6W 9M	-57,8
	L6W	-49,19	L6W 3M	-65,86		

Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD
B	B2W	3,55	B3M	12,07	B9M	-5,41
	B2W	1,78	B3M	10	B9M	1,73
	B2W	13,77	B3M	7,47	B9M	10,63
	B2W	18,75	B3M	7,2	B9M	-1,46
	B2W	12,9	B3M	9,18	B9M	1,64
	B2W	6	B3M	22,81	B9M	-3,77
	B2W	6,04	B6M	-8,4	B9M	1,52
	B1M	10,52	B6M	7,15		
	B1M	8,56	B6M	7,54		
	B1M	6,54	B6M	-3,79		
	B1M	2,52	B6M	-0,3		
	B1M	10,62	B6M	-0,5		
	B1M	6,86	B6M	-0,79		

Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD
LB	LB6W 1M	-42,65	LB6W 6M	-51,96
	LB6W 1M	-46,69	LB6W 6M	-41,4
	LB6W 1M	-41,41	LB6W 6M	-45,33
	LB6W 1M	-45,88	LB6W 6M	-37,23
	LB6W 1M	-43,2	LB6W 6M	-48,24
	LB6W 1M	-38,31	LB6W 6M	-49,62
	LB6W 1M	-34,52	LB6W 6M	-49,97
	LB6W 1M	-31,3	LB6W 6M	-48,4
	LB6W 1M	-43,62	LB6W 9M	-47,41
	LB6W 3M	-48,46	LB6W 9M	-62,75
	LB6W 3M	-54,3	LB6W 9M	-50,83
	LB6W 3M	-58,58	LB6W 9M	-51,7
	LB6W 3M	-54,83	LB6W 9M	-50,17
	LB6W 3M	-52,22	LB6W 9M	-50,35

<b>Gruppe</b>	<b>Untergruppe</b>	<b>relative RD</b>	<b>Untergruppe</b>	<b>relative RD</b>
<b>LV</b>	<b>LV6W1M</b>	-53,36	<b>LV6W3M</b>	-64,97
	<b>LV6W1M</b>	-52,09	<b>LV6W3M</b>	-66,54
	<b>LV6W1M</b>	-38,18	<b>LV6W3M</b>	-62,05
	<b>LV6W1M</b>	-51,81	<b>LV6W3M</b>	-58,49
	<b>LV6W1M</b>	-57,72	<b>LV6W3M</b>	-57,04

**Tabelle 17: Relative RD der einzelnen Tiere jeder Untergruppe der mACHR-M<sub>1</sub>-[<sup>3</sup>H]Pirenzepin.** Jede Untergruppenbezeichnung steht für ein Tier aus der jeweiligen Gruppe. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

M<sub>1</sub>-[<sup>3</sup>H]Pirenzepin

Gruppe	Untergruppe	relative RD	Gruppe	Untergruppe	relative RD	Gruppe	Untergruppe	relative RD					
K	K	-1,37	L	L3W	-8,76	L	L6W1M	-16,78					
	K	-2,91		L3W	-11,02		L6W1M	-19,6	L6W6M	2,93			
	K	-1,55		L3W	-11,92		L6W1M	-20,66	L6W6M	-7,58			
	K	-4,71		L3W	-14,48		L6W1M	-3,9	L6W6M	-10,39			
	K	-0,83		L3W	-11,53		L6W1M	-13,1	L6W6M	-6,64			
	K	-3,98		L3W	-10,66		L6W1M	-9,39	L6W6M	-2,98			
	K	-1,87		L3W	-9,99		L6W1M	-12,9	L6W6M	-7,43			
L	L6W	-11,7	L6W3M	-17,57	L6W9M	-6,58	B	B2W	-6,52	B3M	2,61	B9M	3,13
	L6W	-8,33	L6W3M	-10,18	L6W9M	-4,57		B2W	-7,61	B3M	-0,79	B9M	5,75
	L6W	-13,38	L6W3M	0,28	L6W9M	-6		B2W	-4,3	B3M	-1,94	B9M	14,8
	L6W	-7,63	L6W3M	-10	L6W9M	-9,3		B2W	-10,49	B3M	0,98	B9M	4,13
	L6W	-9,8	L6W3M	-9,74	L6W9M	5,93		B2W	-10,5	B3M	-0,31	B9M	4,64
	L6W	-11,16	L6W3M	-12,63	L6W9M	-4,01		B2W	-8,93	B3M	-2,17	B9M	-0,34
	L6W	-9,34	L6W3M	-5,74				B2W	-1,74	B6M	1,66	B9M	3,92
								B1M	-5,14	B6M	1,5		
								B1M	-6,62	B6M	1,75		
								B1M	-6,73	B6M	-1,27		
								B1M	-3,03	B6M	4,81		
								B1M	-2,84	B6M	7,7		
								B1M	-6,53	B6M	0,97		
Gruppe	Untergruppe	relative RD	Gruppe	Untergruppe	relative RD	Gruppe	Untergruppe	relative RD					
LB	LB6W1M	-2,5	LB	LB6W6M	-3,53	LB	LB6W1M	-4,39					
	LB6W1M	-4,39		LB6W6M	3,91		LB6W1M	-8,31					
	LB6W1M	-8,31		LB6W6M	1,84		LB6W1M	-13,07					
	LB6W1M	-13,07		LB6W6M	4,96		LB6W1M	-9,58					
	LB6W1M	-9,58		LB6W6M	-0,5		LB6W1M	-2,63					
	LB6W1M	-2,63		LB6W6M	-9,22		LB6W1M	-8,68					
	LB6W1M	-8,68		LB6W6M	-11,28		LB6W1M	-6,98					
	LB6W1M	-6,98		LB6W6M	-0,51		LB6W1M	-12,08					
	LB6W1M	-12,08		LB6W9M	-9,62		LB6W3M	2,66					
	LB6W3M	2,66		LB6W9M	9,75		LB6W3M	11,38					
	LB6W3M	11,38		LB6W9M	-0,38		LB6W3M	-6,6					
	LB6W3M	-6,6		LB6W9M	-3,78		LB6W3M	-2,47					
	LB6W3M	-2,47		LB6W9M	-1,98		LB6W3M	-12,31					
	LB6W3M	-12,31		LB6W9M	-3,98								

<b>Gruppe</b>	<b>Untergruppe</b>	<b>relative RD</b>	<b>Untergruppe</b>	<b>relative RD</b>
LV	LV6W1M	-13,67	LV6W3M	-10,62
	LV6W1M	-6,45	LV6W3M	-10,68
	LV6W1M	5,2	LV6W3M	-3,97
	LV6W1M	-9,27	LV6W3M	-5,19
	LV6W1M	-11,68	LV6W3M	-11,19

**Tabelle 18: Relative RD der einzelnen Tiere jeder Untergruppe der mAChR-M<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H]Oxotremorin.** Jede Untergruppenbezeichnung steht für ein Tier aus der jeweiligen Gruppe. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

M<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H]Oxotremorin

Gruppe	Untergruppe	relative RD	Gruppe	Untergruppe	relative RD	Gruppe	Untergruppe	relative RD	
K	K	5,09							
	K	-1,6							
	K	9,54							
	K	1,15							
	K	-1,7							
	K	17,64							
	K	7,66							
Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD	Gruppe	Untergruppe	relative RD
L	L3W	131,76	L6W1M	-8,41	L6W6M	-4,03			
	L3W	132,76	L6W1M	-23,95	L6W6M	-7,34			
	L3W	140,88	L6W1M	-19,76	L6W6M	-10,05			
	L3W	130,8	L6W1M	-2,87	L6W6M	-7,94			
	L3W	199,65	L6W1M	-13,97	L6W6M	-7,08			
	L3W	145,5	L6W1M	-10,24	L6W6M	-4,77			
	L3W	153,73	L6W1M	-11,55	L6W6M	-6,25			
	L6W	156,45	L6W3M	-12,46	L6W9M	-10,85			
	L6W	165,04	L6W3M	-5,25	L6W9M	-11,34			
	L6W	154,72	L6W3M	-9,11	L6W9M	0,08			
	L6W	176,58	L6W3M	-9,85	L6W9M	-14,42			
	L6W	168	L6W3M	-6,85	L6W9M	2,13			
	L6W	149,8	L6W3M	-5,75	L6W9M	-9,4			
	L6W	134,7	L6W3M	6,26					
Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD	Gruppe	Untergruppe	relative RD
B	B2W	-6,89	B3M	5,87	B9M	-0,88			
	B2W	-14,7	B3M	0,63	B9M	21,01			
	B2W	-11,12	B3M	2,66	B9M	28,53			
	B2W	-4,87	B3M	-9,35	B9M	6,24			
	B2W	-7,8	B3M	-2,33	B9M	12,6			
	B2W	-7,34	B3M	-0,14	B9M	8,02			
	B2W	-4,13	B6M	-0,83	B9M	17,47			
	B1M	-8,72	B6M	4,32					
	B1M	-25,26	B6M	-1,82					
	B1M	-11,91	B6M	3,63					
	B1M	-13,27	B6M	4,15					
	B1M	-8,99	B6M	-0,05					
	B1M	-14,62	B6M	9,3					
	Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD	Gruppe	Untergruppe	relative RD	
	LB	LB6W1M	-3,17	LB6W6M	6,43				
LB6W1M		-8,12	LB6W6M	-6,98					
LB6W1M		2,33	LB6W6M	-5,51					
LB6W1M		-8,89	LB6W6M	23,75					
LB6W1M		-14,25	LB6W6M	-6,97					
LB6W1M		-13,61	LB6W6M	-10,31					
LB6W1M		-16,98	LB6W6M	2,67					
LB6W1M		-10,42	LB6W6M	0,92					

<b>Gruppe</b>	<b>Untergruppe</b>	<b>relative RD</b>	<b>Untergruppe</b>	<b>relative RD</b>
LV	LV6W1M	-7,52	LV6W3M	-14,34
	LV6W1M	1,55	LV6W3M	-12,24
	LV6W1M	0,94	LV6W3M	-3,67
	LV6W1M	-5,65	LV6W3M	0,15
	LV6W1M	2,74	LV6W3M	-6,76

**Tabelle 19: Relative RD der einzelnen Tiere jeder Untergruppe der mACHR-M<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H]AF-DX384.** Jede Untergruppenbezeichnung steht für ein Tier aus der jeweiligen Gruppe. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1 M<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H]AF-DX384

Gruppe	Untergruppe	relative RD
K	K	-3,19
	K	-1,99
	K	1,11
	K	1,44
	K	-0,23
	K	-2,8
	K	-0,34

Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD
L	L3W	-10,04	L6W1M	-23,59	L6W6M	-11,98
	L3W	-14,35	L6W1M	-24,16	L6W6M	-11,23
	L3W	-13,74	L6W1M	-25,68	L6W6M	-23,64
	L3W	-12,48	L6W1M	-6,17	L6W6M	-15,18
	L3W	-8,56	L6W1M	-19,44	L6W6M	-13,37
	L3W	-9,48	L6W1M	-16,63	L6W6M	-15,41
	L3W	-9,71	L6W1M	-14,65	L6W6M	-24,69
	L6W	-20,24	L6W3M	-20,7	L6W9M	-18,89
	L6W	-15,75	L6W3M	-12,35	L6W9M	-15,68
	L6W	-12,04	L6W3M	-17,07	L6W9M	-17,39
	L6W	-18,04	L6W3M	-18,83	L6W9M	-18,54
	L6W	-17,09	L6W3M	-14,72	L6W9M	-9,48
	L6W	-15,28	L6W3M	-9,27	L6W9M	-10,48
	L6W	-18,29				

Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD
B	B2W	-18,78	B3M	-10,12	B9M	6,43
	B2W	-22	B3M	-7,31	B9M	0,66
	B2W	-12,82	B3M	-5,72	B9M	8,49
	B2W	-17,07	B3M	-17,75	B9M	-0,46
	B2W	-17,78	B3M	-12,94	B9M	10,01
	B2W	-8,48	B3M	-3,12	B9M	1,73
	B2W	-11,63	B6M	1,06	B9M	-2,15
	B1M	-8,41	B6M	2,06		
	B1M	-21,35	B6M	-3,54		
	B1M	-5,81	B6M	-4,47		
	B1M	-8,95	B6M	0,62		
	B1M	-6,83	B6M	-4,89		
	B1M	-14,24	B6M	4,96		

Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD
LB	LB6W1M	-18,35	LB6W6M	-12,35
	LB6W1M	-19,12	LB6W6M	-13,43
	LB6W1M	-17,04	LB6W6M	-1,5
	LB6W1M	-13,74	LB6W6M	8,2
	LB6W1M	-23,12	LB6W6M	-17,05
	LB6W1M	-22,23	LB6W6M	-19,35
	LB6W1M	-25,13	LB6W6M	-15,47
	LB6W1M	-15,6	LB6W6M	-7,86
	LB6W1M	-25,62	LB6W9M	-16,07
	LB6W3M	-8,45	LB6W9M	1,34
	LB6W3M	-3,28	LB6W9M	-17,01
	LB6W3M	-20,32	LB6W9M	-2,5
	LB6W3M	-16,11	LB6W9M	-14,09
	LB6W3M	-32,3	LB6W9M	-1,39

<b>Gruppe</b>	<b>Untergruppe</b>	<b>relative RD</b>	<b>Untergruppe</b>	<b>relative RD</b>
LV	LV6W1M	-17,62	LV6W3M	-9,5
	LV6W1M	-14,59	LV6W3M	-17,14
	LV6W1M	-0,08	LV6W3M	-18,96
	LV6W1M	-16,54	LV6W3M	-10,12
	LV6W1M	-21,97	LV6W3M	-14,95

**Tabelle 20: Relative RD der einzelnen Tiere jeder Untergruppe der mACHR-M<sub>3</sub>-[<sup>3</sup>H]4-DAMP.** Jede Untergruppenbezeichnung steht für ein Tier aus der jeweiligen Gruppe. Untergruppenbezeichnungen s. Tabelle 1

M<sub>3</sub>-[<sup>3</sup>H]4-DAMP

Gruppe	Untergruppe	relative RD
K	K	0,46
	K	2,43
	K	-0,1
	K	4,97
	K	1,92
	K	-3,82
	K	3,12

Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD
L	L3W	0,93	L6W1M	-9,36	L6W6M	-6,28
	L3W	-6,74	L6W1M	-13,21	L6W6M	-0,34
	L3W	-6,2	L6W1M	-10,32	L6W6M	-4,54
	L3W	-7,07	L6W1M	-1,26	L6W6M	-9,45
	L3W	-3,4	L6W1M	-8,71	L6W6M	-6,41
	L3W	-9,18	L6W1M	-8,3	L6W6M	-3,26
	L3W	-4,69	L6W1M	-9,83	L6W6M	-7,2
	L6W	-2,54	L6W3M	-6,08	L6W9M	-9,29
	L6W	-3,98	L6W3M	-3,25	L6W9M	-5,43
	L6W	-0,6	L6W3M	-2,6	L6W9M	-6,05
	L6W	4,42	L6W3M	-3,5	L6W9M	-5,99
	L6W	-6,17	L6W3M	-14,63	L6W9M	1,42
	L6W	0,28	L6W3M	-11,72	L6W9M	-4,72
	L6W	-4,89	L6W3M	-5,06		

Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD
B	B2W	-6,12	B3M	5,69	B9M	10,49
	B2W	1,27	B3M	-6,06	B9M	5,38
	B2W	-2,2	B3M	-4,52	B9M	8,4
	B2W	-3,39	B3M	1,37	B9M	8,58
	B2W	-6,85	B3M	-3,64	B9M	13,2
	B2W	-8,72	B3M	-5,23	B9M	1,1
	B2W	4,13	B6M	-8,38	B9M	7,45
	B1M	15,24	B6M	16,25		
	B1M	-9,13	B6M	3,95		
	B1M	-2,71	B6M	1,9		
	B1M	3,65	B6M	7,63		
	B1M	-5,42	B6M	9,68		
	B1M	0,26	B6M	0,12		

Gruppe	Untergruppe	relative RD	Untergruppe	relative RD
LB	LB6W1M	-9,66	LB6W6M	7,59
	LB6W1M	-6,97	LB6W6M	-0,26
	LB6W1M	-9,93	LB6W6M	9,09
	LB6W1M	-5,19	LB6W6M	4,2
	LB6W1M	6,24	LB6W6M	-1,9
	LB6W1M	-7,99	LB6W6M	-5,48
	LB6W1M	-6,11	LB6W6M	-8,79
	LB6W1M	-9,58	LB6W6M	-3,95
	LB6W1M	-10,89	LB6W9M	-4,03
	LB6W1M	-2,95	LB6W9M	-0,76
	LB6W3M	-5,49	LB6W9M	-5,14
	LB6W3M	14,04	LB6W9M	4,67
	LB6W3M	-8,7	LB6W9M	-1,77
	LB6W3M	-4,57	LB6W9M	-4,76
	LB6W3M	-8,97	LB6W9M	1,65

<b>Gruppe</b>	<b>Untergruppe</b>	<b>relative RD</b>	<b>Untergruppe</b>	<b>relative RD</b>
LV	LV6W1M	-8	LV6W3M	-0,81
	LV6W1M	-1,25	LV6W3M	-1,01
	LV6W1M	7,17	LV6W3M	-6,23
	LV6W1M	-5,4	LV6W3M	-3,14
	LV6W1M	4,06	LV6W3M	-6

## 5.5 Veröffentlichungen

Klawitter F., Schmitt O., Hawlitschka A., Cremer M., Zilles K., Wree A.

**Densities of acetylcholine receptors in hemiparkinsonian rat striatum following botulinum neurotoxin A injection**

(Posterbeitrag - 110. Treffen der Deutschen Anatomischen Gesellschaft, 23. - 25. September 2015, Würzburg)

Mann T, Zilles K, Klawitter F, Cremer M; Hawlitschka A, Schmitt O, Wree A

**Acetylcholine neurotransmitter receptor densities in the striatum of hemiparkinsonian rats following Botulinum neurotoxin-A injection**

(in Vorbereitung)

## **5.6 Erklärung der eigenständigen Anfertigung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben. Darüber hinaus habe ich keine, außer die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen eingesetzt. Inhalte und Abbildungen anderer Arbeiten sind als solche kenntlich gemacht.

Rostock, 12.09.2017

Felix Klawitter

## 5.7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name:	Felix Klawitter
Geburtsdatum/-ort:	11.08.1990, Wismar
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	ledig

### Bildungsweg

seit 11/2016	Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universitätsmedizin Rostock
11/2016	Approbation als Arzt
11/2016	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2015 – 10/2016	Praktisches Jahr an der Universitätsmedizin Rostock
10/2015	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2012	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2010	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Rostock
2009 – 2010	Zivildienst Malteser Wismar
2009	Abitur Geschwister-Scholl-Gymnasium, Wismar

## **6. Danksagung**

Bedanken möchte ich mich zuerst bei Herrn Prof. Dr. Wree, der mich mit dem Promotionsthema betraut hat und mir die Möglichkeit gab, die vorliegende Dissertation zu verfassen. Auch danke ich Ihm für seine Geduld und die für zahlreiche Fragen stets offene Bürotür. Weiterhin gilt besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Schmitt, für die umfassende Hilfe, Betreuung und Geduld im Umgang mit der verwendeten Software, der Datensichtung, der Diagrammerstellung und der statistischen Auswertung. Frau Teresa Mann danke ich herzlichst für Ihre zahlreichen Ratschläge und Hinweise bei dieser Dissertation. Auch möchte ich mich bei Frau Dr. Antipova für die Sichtung der wissenschaftlichen Literatur bedanken. Herrn Dr. Hawlitschka möchte ich für die aufschlussreichen Vorträge und die Erläuterungen zu den methodischen Aspekten danken.

Ich danke meinen Eltern, die mich mit Ihrer ganzen Kraft unterstützt haben. Ich danke Robert Steinhagen für die Tipps rund um das Thema Promotion. Ich danke meiner Freundin Svenja, die mich immer wieder motiviert und in den Jahren der Anfertigung dieser Promotionsarbeit unterstützt hat.