Suszeptibilitätsunterschiede im MPTP-Mausmodell für Morbus Parkinson: Untersuchung genetischer Einflußfaktoren anhand von Stammvergleichen

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marco Sedelis

aus Hamburg

Düsseldorf

2001

dissertation.de - Verlag im Internet GmbH
Sonderausgabe des Werkes mit der ISBN-Nummer: 3-89825-238-8

dissertation.de - Verlag im Internet GmbH
Fritschestr. 68
10 585 Berlin
E-Mail: dissertation.de@snafu.de
URL: http://www.dissertation.de

Danksagungen

Herzlich danken möchte ich den folgenden Personen, die mit dazu beigetragen haben, daß diese Arbeit entstehen konnte:

- Herrn Prof. Dr. Rainer K.W. Schwarting, der in allen Phasen meiner Arbeit ein hervorragender Ansprechpartner und Ratgeber war.
- Herrn Prof. Dr. Joseph P. Huston, der unser Projekt und meinen Beitrag dazu jederzeit bestens unterstützt und gefördert hat.
- Frau Dr. Katja Hofele, der ich für die vertrauensvolle Zusammenarbeit verbunden bin. Ihr gebührt auch besonderer Dank für ihre Geduld im Wahljahr 1998.
- Frau Dr. Sarah Morgan für ihre arbeitsintensive Hilfe bei der histologischen Auswertung der Hirnschnitte.
- Herrn Dr. Christian Frisch und Frau Dr. Christiane M. Thiel, die das Manuskript korrekturgelesen haben. Letzterer gebührt Hochachtung für ihre Disziplin, dabei kein "Schwabendeutsch" in die Arbeit hineingeschmuggelt zu haben.
- Herrn cand. psych. Ingo Willuhn, der bei der Durchführung und Auswertung mehrerer Experimente sehr engagiert mitgewirkt hat.
- Den übrigen Kolleginnen und Kollegen vom Institut für Physiologische Psychologie, die auf verschiedene Art das Gelingen des Projektes befördert haben. Ich danke auch Herrn Milan Srejic und Herrn Dipl.-Physik-Ing. Manfred Mittelstaedt für ihre technische Unterstützung.
- Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Tierversuchsanlage (TVA), die uns auf unterschiedliche Weise tatkräftig unterstützt haben. Ausdrücklich erwähnen möchte ich Frau Dr. Treiber sowie Frau Dr. Brumloop, die für uns einige pathologische Untersuchungen vorgenommen hat.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projektes Hu 306/21-1. Der Autor war Stipendiat des DFG-Graduiertenkollegs "Pathologische Prozesse des Nervensystems - Vom Gen zum Verhalten".

Aus dem Institut für Physiologische Psychologie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. R.K.W. Schwarting
Korreferent: Prof. Dr. J.P. Huston

Tage der mündlichen Prüfungen:

26.01.2001	Psychologie	Prof. Dr. J.P. Huston
29.01.2001	Hirnforschung	Prof. Dr. G. Rehkämper
02.02.2001	Mikrobiologie	Prof. Dr. C.P. Hollenberg

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 9

1 Einleitung 11

1.1 Einführende Bemerkungen 11

1.2 Der Neurotransmitter Dopamin 11

1.2.1 Metabolismus 12

1.2.2 Rezeptortypen 14

1.2.3 Dopaminerge Systeme 14

1.2.4 Pharmakologische Beeinflussung dopaminerger Neurotransmission 15

1.3 Morbus Parkinson 16

1.3.1 Symptomatik und Neuropathologie 16

1.3.2 Ätiologie 17

1.4 Das MPTP-Modell für Morbus Parkinson 20

1.4.1 Entdeckungs- und Entstehungsgeschichte 20

1.4.2 Wirkungsweise 21

1.4.3 Neuronale Veränderungen nach MPTP-Gabe in der Maus 24

1.4.4 Verhaltensänderungen nach MPTP-Gabe in der Maus 25

1.4.4.1 Allgemeine Beobachtungen 25

1.4.4.2. Akinesie/Hypokinesie/Bradykinesie 26

1.4.4.3 Tremor 36

1.4.4.4 Rigor 36

1.4.4.5 Störungen von Gang, Haltung und motorischem Koordinationsvermögen 36

1.4.4.6 Andere Symptome 38

1.4.5 Stammunterschiede im MPTP-Mausmodell 42

1.4.6 Mögliche Determinanten von Suszeptibilitätsunterschieden 44

1.4.7 Geschlechtsunterschiede 49

1.4.8 Altersunterschiede 51

1.5 Quantitative Trait Loci-(QTL)-Analysen 51

1.5.1 Problemstellung 51

1.5.2 Experimentelle Ansätze 52

1.5.3 Ablauf einer QTL-Analyse 53

2 Gegenstand und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit 57
2.1 Skizzierung eines QTL-Mapping-Projektes der MPTP-Suszeptibilität 57
2.2 Fragestellungen 60

3 Material und Methoden 65
3.1 Tiere und Tierzucht 65
3.2 Tierhaltung 65
3.3 Substanzen und Injektion 66
3.3.1 Substanzen und Injektion 66
3.3.2 Sicherheitsmaßnahmen 66
3.4 Verhaltensmessungen 67
3.4.1 Offenfeld 68
3.4.2 Greif-Test 68
3.4.3 Rotarod 69
3.4.4 Pole-Test 69
3.4.5 Nestbau 70
3.4.6 Elevated Plus-Maze 70
3.5 Neurochemische Untersuchungen 71
3.5.1 Probengewinnung 71
3.5.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie 72
3.6 Histologische Untersuchungen 73
3.6.1 Immunhistochemische Präparation 73
3.6.2 Zellzählung 73
3.7 Gewebeentnahme zwecks genetischer Analyse 73
3.8 Datenauswertung und Statistik 74

4 Ergebnisse und Einzeldiskussionen 77
4.1 Vorversuch 77
4.1.1 Einleitung 77
4.1.2 Durchführung 77
4.1.3 Ergebnisse 78
4.1.3.1 Verhalten 78
4.1.3.2 Neurochemie 83
4.1.3.3 Histologie 85

4.1.4 Diskussion 85
4.2 Parentalgeneration 90
4.2.1 Einleitung 90
4.2.2 Durchführung 90
4.2.3 Ergebnisse 91
4.2.3.1 Dosierungen MPTP4x20, MPTP2x20x2 und MPTP4x10 91
4.2.3.2 Dosierung MPTP4x15 92
4.2.3.2.1 Verhalten 92
4.2.3.2.2 Neurochemie 101
4.2.3.2.3 Histologie 103
4.2.3.2.4 Letalität 104
4.2.3.2.5 Körpergewicht 105
4.2.3.2.6 Beziehungen zwischen Verhaltensmaßen im Offenfeld und neuralen Parametern 106
4.2.4 Diskussion 106
4.3 F1-Generation 119
4.3.1 Einleitung 119
4.3.2 Durchführung 119
4.3.3 Ergebnisse 119
4.3.3.1 Verhalten 119
4.3.3.2 Neurochemie 125
4.3.3.3 Histologie 128
4.3.3.4 Letalität 129
4.3.3.5 Körpergewicht 129
4.3.4 Diskussion 129
4.4 F2-Generation 136
4.4.1 Einleitung 136
4.4.2 Durchführung 137
4.4.3 Ergebnisse 138
4.4.3.1 Verhalten 138
4.4.3.2 Neurochemie 143
4.4.3.3 Histologie 148
4.4.3.4 Letalität, Pathologie und periphere Effekte von MPTP 149
4.4.3.5 Körpergewicht 152

4.4.3.6 Beziehungen der neostriatalen DA-Depletion zu Pigmentierung und Offenfeldverhalten 152
4.4.4 Diskussion 155
4.5 Folgeuntersuchung 1: Tyrosinase 163
4.5.1 Einleitung 163
4.5.2 Durchführung 163
4.5.3 Ergebnisse 164
4.5.3.1 Verhalten 164
4.5.3.2 Neurochemie 170
4.5.3.3 Histologie 172
4.5.3.4 Letalität 173
4.5.3.5 Körpergewicht 173
4.5.4 Diskussion 173
4.6. Folgeuntersuchung 2: Letalität 177
4.6.1 Einleitung 177
4.6.2 Durchführung 178
4.6.3 Ergebnisse 179
4.6.3.1 Verhalten 179
4.6.3.2 Letalität und Pathologie 179
4.6.4 Diskussion 180

5 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick 183

6 Literaturverzeichnis 195

7 Abkürzungsverzeichnis 235

Anhang 237

Zusammenfassung

Die Applikation des Neurotoxins 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) kann in der Maus zu einer Schädigung des nigrostriatalen Systems führen und dient als ein Modell für die humane Parkinson-Krankheit. Stammvergleiche haben gezeigt, daß das Ausmaß der Schädigung - gemessen am Verlust von Dopamin (DA) im Neostriatum oder am nigralen Zellverlust - zwischen verschiedenen Mausstämmen beträchtlich variieren kann. Solche Befunde lassen die Annahme zu, daß die Suszeptibilität gegenüber MPTP zumindest teilweise von der genetischen Ausstattung der Tiere abhängt.

In der hier vorgestellten Serie von Experimenten wurde das Vorhandensein derartiger genetischer Einflußfaktoren mittels gezielter Stamm- und Generationenvergleiche genauer untersucht. Dabei erfolgte die Charakterisierung der Schädigung mittels einer Reihe von Verhaltenstests (Offenfeld, Nestbau im Heimkäfig, Greif-Test, Rotarod, Pole-Test und Elevated Plus-Maze), mittels *post mortem* erhobener neurochemischer Maße in mehreren Hirnregionen sowie mittels Zählung von Tyrosinhydroxylase-immunopositiven Neuronen in Substantia nigra und Area ventralis tegmentalis. Alle Stämme und Generationen wurden mit derselben MPTP-Dosis behandelt und nahezu identischen Untersuchungsplänen unterzogen.

Zunächst wurden die Auswirkungen von MPTP in Männchen und Weibchen der beiden Mausstämme C57BL/6 (pigmentiert) und BALB/c (unpigmentiert), für die anhand von früheren Literaturangaben unterschiedliche MPTP-Suszeptibilitäten vermutet wurden, miteinander verglichen. Der Stamm C57BL/6 erwies sich auf allen Betrachtungsebenen als sehr anfällig: MPTP-Gabe führte unter anderem zu verringerter Lokomotion im Offenfeld, welche erst nach mehreren Tagen wieder auf das Niveau von Kontrollen anstieg, verzögertem Beginn des Nestbaus, hohem neostriatalem DA-Verlust und nigralem Zellverlust. BALB/c-Tiere zeigten dagegen raschere funktionelle Erholung im Offenfeld und einen deutlich geringeren DA-Verlust; in diesem Stamm wurde weder eine Verzögerung des Nestbaus noch ein nigraler Zellverlust gefunden. In beiden Stämmen wurde bei einigen Tieren Letalität beobachtet.

Diese unterschiedlich MPTP-anfälligen Stämme wurden zu reziproken F1-Linien verkreuzt. Die F1-Generation als Ganzes präsentierte sich noch MPTP-resistenter als der resistentere Parentalstamm BALB/c, d.h. erneut wurden rasche funktionelle Erholung, kein Zellverlust und ein noch geringerer DA-Verlust beobachtet; Letalität trat nicht auf.

In der F2-Generation, die aus der getrennten Verkreuzung der F1-Linien gebildet wurde und deren Individuen sich im Gegensatz zu den beiden vorhergehenden Generationen genetisch voneinander unterscheiden, traten ebenfalls nur sehr geringe Verhaltensdefizite auf. Zwischen neurotoxischen und letalen Effekten von MPTP trat eine geschlechtsabhängige Dissoziation

zutage: Weibchen beider F2-Linien wiesen - gemessen am DA-Verlust - sehr geringe nigrostriatale Schädigungen, aber eine beträchtliche Letalitätsrate auf, während die Männchen bei Abwesenheit von MPTP-bedingter Letalität im Mittel ein Schädigungsniveau in Höhe der BALB/c-Tiere hatten. Bei einer Einteilung der F2-Tiere in "pigmentiert" und "unpigmentiert" war für unpigmentierte Männchen in einer der beiden Teilkreuzungen ein etwas geringerer DA-Verlust zu verzeichnen.

Die Ergebnisse in der F2-Generation gaben Anlaß für zwei Folgestudien: In der ersten wurden pigmentierte C57BL/6-Männchen mit unpigmentierten Mutanten verglichen, die sich nur im Tyrosinase-Gen unterschieden; Tyrosinase ist ein Schlüsselenzym bei der Bildung des Pigmentfarbstoffs Melanin. Hier waren die unpigmentierten C57BL/6-Mutanten tendenziell sogar stärker MPTP-anfällig als die pigmentierten C57BL/6-Mäuse. Dieser Befund, der mit den obengenannten Ergebnissen bei F2-Männchen und der in der Literatur gelegentlich vermuteten höheren Anfälligkeit pigmentierter Mäuse kontrastiert, spricht gegen eine Rolle von Melanin in der MPTP-Anfälligkeit, läßt aber die Möglichkeit offen, daß möglicherweise Gene, die in Albino-Stämmen mit dem Tyrosinase-Gen gekoppelt vererbt werden, auf die Anfälligkeit einen Einfluß haben. In der zweiten Folgestudie wurde der Frage, ob der weibliche Zyklus (bzw. damit verbundene hormonelle Schwankungen) Auswirkungen auf die Letalität haben könnte, nachgegangen, indem C57BL/6-Weibchen in unterschiedlichen Zyklusphasen mit MPTP behandelt wurden. Da in diesem Versuch jedoch keine Letalität auftrat, konnte die Frage nicht beantwortet werden; mögliche Ursachen sowie Konsequenzen für weitere Studien werden diskutiert.

Die Gesamtheit der Ergebnisse liefert einen klaren Beleg dafür, daß genetische Unterschiede zu differentieller MPTP-Anfälligkeit führen können, was sich sowohl an Verhaltensparametern als auch an neuralen Indikatoren ablesen ließ; darüber hinaus ist auch eine genetische Beteiligung am Phänomen der MPTP-bedingten Letalität denkbar. Anhand des Vergleichs der Ergebnisse in den drei getesteten Generationen kann vermutet werden, daß an der Ausprägung des Phänotyps "MPTP-Suszeptibilität" *mehrere* Gene beteiligt sind. Für solche polygenen Eigenschaften ist es prinzipiell möglich, mittels heuristischer Methoden ("Quantitative Trait Loci Mapping"), welche den Phäno- und Genotyp miteinander in Beziehung setzen, innerhalb des Genoms Genorte zu identifizieren, die die Merkmalsausprägung mitbedingen. Für eine solche Analyse stünde mit der in dieser Arbeit charakterisierten F2-Generation die erforderliche große Zahl genetisch heterogener Individuen zur Verfügung; der Parameter "neostriataler Dopamin-Verlust" scheint dabei als phänotypischer Marker am besten geeignet zu sein, da dieser auch zwischen Tieren mit niedrigem Läsionsniveau ausreichend gut differenziert.

1 Einleitung

1.1 Einführende Bemerkungen

Die rasanten Entwicklungen und Forschungsanstrengungen auf dem Gebiet der Genetik haben das Wissen über Erbeinflüsse auf die unterschiedlichsten Merkmale von Organismen in den letzten Jahren explosionsartig vermehrt. Dabei sind zunehmend komplexe Merkmale wie Lernprozesse in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses gerückt, und es ist beispielsweise bereits gelungen, einzelne Lernprozeßschritte genetischen Mechanismen zuzuordnen [109]. Ähnliches gilt auch für Krankheiten, z.B. solche des Nervensystems: So konnte für die Alzheimer-Krankheit, die zu schwerer Demenz führt, mittlerweile eine Reihe genetischer Faktoren identifiziert werden, die zur Ausbildung dieser neurokognitiven Erkrankung beitragen [393]. Bei der Untersuchung solch komplexer Fragestellungen ist eine Verzahnung von Arbeitsgebieten unerläßlich. In den genannten Beispielen sind es u.a. die Verhaltensgenetik und Neurogenetik, also interdisziplinäre Wissenschaftszweige, die sich mit der Beziehung zwischen Verhaltens- bzw. neuronalen Parametern und der Erbinformation befassen (im Englischen wird dies sprachlich mit dem Begriff "neurobehavioural genetics" oft als Einheit ausgedrückt).

Die vorliegende Arbeit beschreibt einen Ansatz, der mit Methoden der Physiologischen Psychologie arbeitet, also derjenigen Disziplin, die sich mit den Zusammenhängen zwischen physiologischen Vorgängen und Verhalten beschäftigt. Die hier vorgestellten Studien sind jedoch so angelegt, daß sie auch eine Analyse genetischer Komponenten ermöglichen. Konkret wird ein Tiermodell für eine neurodegenerative Erkrankung, den Morbus Parkinson, für deren Entstehung ebenfalls eine Beteiligung genetischer Mechanismen angenommen wird, untersucht: Mittels des Neurotoxins 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) wird in Mäusen eine dieser humanen Erkrankung sehr ähnliche Pathologie erzeugt, und die Auswirkung von Vererbungseinflüssen auf Verhaltens- und neuronale Veränderungen wird anhand gezielter Stammvergleiche geprüft.

1.2 Der Neurotransmitter Dopamin

Seitdem in den späten fünfziger Jahren entdeckt wurde, daß Dopamin (DA) als Neurotransmitter im Gehirn fungiert, hat sich für diesen Botenstoff rasch ein starkes und anhaltendes Forschungsinteresse entwickelt. Aus verhaltensneurowissenschaftlicher Sicht ist Dopamin von großer Bedeutung, da es funktional mit wichtigen allgemeinpsychologischen Funktionen

wie Lernen, Motivation und Aufmerksamkeit in Verbindung gebracht wird und darüber hinaus auch mit pathologischen Phänomenen wie Schizophrenie, Suchtverhalten - und Morbus Parkinson [368]. Im folgenden werden einige Fakten zu Metabolismus, Pharmakologie und neuroanatomischer Verteilung von Dopamin im Gehirn vorgestellt. Dieser Abschnitt wurde bewußt sehr kurz gefaßt, da die genannten Themengebiete in neurowissenschaftlichen Standardlehrwerken erschöpfend behandelt werden (hervorragend z.B. [117]) und auch in früheren Dissertationen aus dem Institut für Physiologische Psychologie bereits sehr ausführlich dargestellt worden sind (z.B.[129,370]).

1.2.1 Metabolismus

Dopamin wird chemisch der Klasse der biogenen Monoamine und hier der Untergruppe der Katecholamine zugerechnet. Abb. 1 stellt den Syntheseweg und den Abbau von Dopamin dar. Ausgehend von der Aminosäure Tyrosin wird Dihydroxyphenylalanin (DOPA) synthetisiert, aus dem durch Dekarboxylierung Dopamin gebildet wird. Der durch Tyrosinhydroxylase (TH) katalysierte Reaktionsschritt ist von besonderer Bedeutung, da das Syntheseprodukt DA die TH-Aktivität im Sinne einer negativen Rückkopplung hemmt. Das Dopamin wird durch den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) aus dem Zytoplasma hocheffektiv in Vesikel transportiert, in denen es gespeichert wird. Es wird angenommen, daß es unterschiedliche Speichermodi gibt, nämlich eine schnell verfügbare Form (neu synthetisiertes DA), im Zytoplasma vorhandenes DA und ein inaktives Reservoir, wobei diese verschiedenen Anteile in einem Gleichgewicht stehen. Die Ausschüttung von Dopamin in den synaptischen Spalt geschieht durch Exozytose, d.h. bei entsprechender elektrischer Aktivität wandern Vesikel zur präsynaptischen Membran und setzen das Dopamin frei.

Die Beseitigung von DA aus dem synaptischen Spalt kann dadurch erfolgen, daß Dopamin durch einen in der präsynaptischen Membran gelegenen Transporter (DAT) zurücktransportiert wird und somit dem Zytoplasma-Pool wieder zugeführt wird. Daneben kann die Katabolisierung erfolgen: DA wird dabei entweder enzymatisch zu Dihydroxyphenylessigsäure (DOPAC) umgewandelt, das zum kleineren Teil ausgeschieden, zum überwiegenden Teil aber weiter zum Endabbauprodukt Homovanillinsäure (HVA) umgewandelt wird. Alternativ kann HVA auch über den Zwischenschritt 3-Methoxytyramin (3-MT) entstehen. An beiden Abbauwegen sind zwei Enzyme beteiligt, die Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) und die Monoamin-Oxidase (MAO). Letztere liegt in zwei Formen vor, die sich hinsichtlich der Substratspezifität unterscheiden, wobei die Monoamine Serotonin, Adrenalin und Noradrenalin

eine höhere Affinität zu MAO-A als zu MAO-B haben, während DA von beiden Formen in etwa gleichem Maß deaminiert wird.

Da die Bildung von DOPAC im Gegensatz zu 3-MT vornehmlich intraneuronal erfolgt, wird DOPAC oft als bester Indikator für intraneuronalen Katabolismus angesehen, während 3-MT als guter Indikator für den Katabolismus von freigesetztem DA verstanden wird [117]. Oftmals ist es von Interesse, die Rate der Transmitternutzung ("turnover") zu bestimmen. Dazu werden die Konzentrationen der genannten Metaboliten in Bezug gesetzt zur Konzentration von DA, wobei eine Erhöhung dieses Quotienten als Hinweis für einen erhöhten Umsatz verstanden wird.

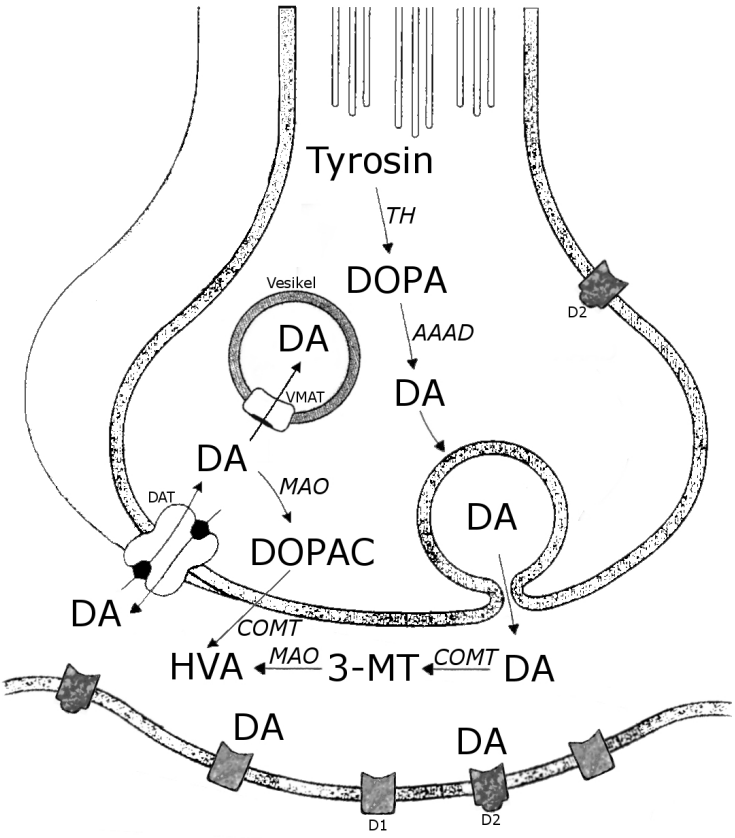

Abb. 1. Metabolismus des Neurotransmitters Dopamin. AAAD = aromatische Aminosäuren-Dekarboxylase; COMT = Catechol-O-Methyl-Transferase; D1/D2 = Dopamin-D_1/D_2-Rezeptor; DA = Dopamin; DAT = Membran-Dopamintransporter; DOPA = Dihydroxyphenylalanin; DOPAC = Dihydroxyphenylessigsäure; HVA = Homovanillinsäure; MAO = Monoamin-Oxidase; 3-MT = 3-Methoxytyramin; TH = Tyrosinhydroxylase; VMAT = vesikulärer Monoamintransporter. Nähere Erläuterungen im Text. Darstellung modifiziert nach [117].

1.2.2 Rezeptortypen

Es sind verschiedene Rezeptortypen für Dopamin identifiziert worden. Sie werden üblicherweise in zwei Familien aufgeteilt, die D_1- und die D_2-Familie. Zur ersten Familie zählen der D_1- und der D_5-Rezeptor, zur zweiten die Rezeptortypen D_2, D_3 und D_4. Die einzelnen Typen unterscheiden sich in den nachgeschalteten postsynaptischen Signalübertragungsmechanismen ("second messengers") und in ihrer regionalen Verteilung. Beispielsweise finden sich in Neostriatum und ventralem Striatum (siehe Abschnitt 1.1.3) überwiegend D_1-, D_2-, und D_3-Rezeptoren.

Neben ihrer postsynaptischen Lokalisation lassen sich DA-Rezeptoren auch präsynaptisch finden, wo sie als Autorezeptoren fungieren. Ihre Aktivierung hemmt die DA-Synthese und DA-Ausschüttung und kann die Feuerrate der Neuronen senken. Die Identität dieser Autorezeptoren ist bislang nicht eindeutig geklärt; zwar scheinen die Autorezeptoren den D_2-Rezeptoren ähnlich zu sein, aber es ist andererseits beispielsweise gefunden worden, daß geringe Dosen des DA-Rezeptoragonisten Apomorphin bevorzugt die Autorezeptoren statt der postsynaptischen D_2-Rezeptoren ansprechen; nach neueren Befunden könnten auch die D_3-Rezeptoren als Autorezeptoren in Frage kommen [117].

1.2.3 Dopaminerge Systeme

Eine Besonderheit der Substanz Dopamin in seiner Funktion als Neurotransmitter ist die Tatsache, daß sein Vorkommen im Gehirn regional relativ eng umschrieben ist, anders als z.B. der Neurotransmitter Azetylcholin. Es werden mehrere dopaminerge Faserzüge unterschieden.

1. Das sogenannte **mesostriatale System** wird in einen dorsalen und einen ventralen Teil gegliedert:

a) Die dorsale Komponente wird auch als nigrostriatale Bahn bezeichnet; sie entspringt in der im Mesenzephalon lokalisierten Substantia nigra (SN), in der die Somata der dopaminergen Neuronen liegen, und projiziert in erster Linie zum Nucleus caudatus, zum Putamen und zum Globus pallidus im Prosenzephalon. Nucleus Caudatus und Putamen sind beim Primaten durch die Capsula interna voneinander getrennt, bilden aber bei Nagern eine Einheit und werden zusammen auch als Caudato-Putamen oder Neostriatum (oder auch kurz: Striatum) bezeichnet. Die nigrostriatale Bahn ist ein wichtiger Teil der sogenannten Basalganglien (siehe Abschnitt 1.3.1).

b) Ventral zur SN liegt die Area tegmentalis ventralis (VTA), deren Neuronen hauptsächlich zum Nucleus accumbens (Nacc) und zum Tuberculum olfactorium projizieren; diese Zielregion wird auch ventrales Striatum genannt. Diese ventrale Komponente des mesostriatalen Systems trägt auch die Bezeichnung mesolimbische Bahn.

2. Als weiteres wichtiges System ist das **mesolimbokortikale System** zu nennen. Sein Ursprung liegt in der medialen SN, in der VTA und dem retrorubralen Nucleus. Projektionsgebiete sind verschiedene prosenzephale limbische und kortikale Gebiete, namentlich Septum, Amygdala, limbische Hirnstammanteile, Habenula sowie entorhinaler, präfrontaler und anteriorer cingulärer Kortex.

Daneben gibt es noch eine Reihe kleinerer DAerger Systeme, die hier aber nicht aufgeführt werden; statt dessen sei auf die umfassenden Darstellungen in mehreren Übersichtsarbeiten verwiesen, aus denen auch alle in diesem Abschnitt aufgeführten Informationen entnommen wurden [38,113,114,254].

1.2.4 Pharmakologische Beeinflussung dopaminerger Neurotransmission

Es stehen zahlreiche Pharmaka zur Verfügung, mit denen einzelne Funktionen dopaminerger Neurotransmission beeinflußt werden können. Unter anderem hat die Erforschung der Wirkungsweise vieler dieser Substanzen zu dem umfangreichen Wissen über die Prozesse in dopaminergen Neuronen beigetragen. Stichwortartig sei hier nur aufgeführt, daß verschiedene Pharmaka die Synthese (α-Methylparatyrosin) oder die Katabolisierung (COMT- oder MAO-Hemmer) von DA verhindern, die Ausschüttung von DA induzieren (Amphetamin) oder die Entleerung der Vesikeln bewirken (Reserpin) können. Es stehen ferner Substanzen zur Verfügung, die den DAT blockieren (Kokain), wodurch die Wiederaufnahme von DA ins Neuron verhindert wird. Schließlich existiert auch eine reichhaltige Palette an Rezeptoragonisten und -antagonisten, die mehr oder weniger selektiv an einzelnen DA-Rezeptor-Subtypen wirken. Zu den bekanntesten zählen dabei der D_2-Rezeptorantagonist Haloperidol ("Haldol") und der gemischte D_1/D_2-Rezeptoragonist Apomorphin [117,129].

1.3 Morbus Parkinson

1.3.1 Symptomatik und Neuropathologie

Morbus Parkinson (PD) ist eine häufig auftretende neurodegenerative Erkrankung [238,344]. Typischerweise bricht die Krankheit nicht vor der 5. Lebensdekade aus, und ihre Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter stark an [284]. Hauptmerkmal von PD ist eine zunehmende motorische Beeinträchtigung der betroffenen Patienten; die Kernsymptome sind Akinesie (stark eingeschränkte Fähigkeit, eine Bewegung zu beginnen), Rigor (zahnradartiger Widerstand gegen passive Bewegung von Gliedmaßen) und ein Ruhetremor (Zittern von Gliedmaßen). Daneben sind - je nach individueller Ausprägung des Syndroms - Störungen von Gang und Haltung, vegetative Symptome sowie kognitive [421,464] und emotionale [376] Störungen wie depressive Verstimmungen zu finden. Für erschöpfende Darstellungen der Symptomatik siehe [117,276,333,375].

Das prominenteste neuronale Korrelat der Erkrankung ist eine fortschreitende Degeneration dopaminerger Neuronen der nigrostriatalen Bahn; dies ruft einen drastischen Abfall der Dopaminkonzentration im Caudato-Putamen hervor. Außerdem werden in den verbliebenen Neuronen der Substantia nigra *post mortem* häufig Einschlüsse gefunden, die durch Anfärbung mit Eosin sichtbar gemacht werden können und als Lewy-Körper bezeichnet werden [132].

Dopaminverluste von weniger als etwa 80% können vom Organismus derart kompensiert werden, daß es zu keiner Symptomatik kommt. Bei ca. 80% Dopaminverlust (bezogen auf Kontrollpersonen) tritt eine leichte Symptomatik zutage, eine schwerere Symptomatik ist mit Verlusten über 90% assoziiert [471]. Wie bereits erwähnt, werden Substantia nigra und Caudato-Putamen zu den Basalganglien gezählt, einem sehr komplexen Netzwerk von Kernen, das mit vielen kortikalen und thalamischen Strukturen verschaltet ist. Diesem System wird u.a. eine bedeutsame Rolle bei der Steuerung von Willkürbewegungen zugeschrieben, z.B. bei deren Initiierung [186] oder Selektion [217]. Modellannahmen gehen davon aus, daß die veränderte dopaminerge Neurotransmission von der SN zum Caudato-Putamen ein Ungleichgewicht zwischen hemmenden und erregenden Bahnen innerhalb der Basalganglien erzeugt, welches schließlich zu den genannten motorischen Symptomen führt [32,80,96]. Da die funktionelle Neuroanatomie dieses Systems für die in der vorliegenden Arbeit experimentell untersuchte Fragestellung jedoch nicht von primärer Bedeutung ist, wird hier auf eine eingehendere Darstellung verzichtet und auf die zahlreich vorliegenden umfassenden Übersichtsarbeiten verwiesen [5,67,175,186,217,289,390,447,455]. Angemerkt werden soll an dieser Stelle

nur, daß unter Säugern eine starke Homologie der Basalganglien besteht, so daß die gängigen Arbeitsmodelle hinsichtlich (funktioneller) Anatomie, Verschaltung und Neurotransmission aus Daten entwickelt worden sind, die sowohl an Primaten als auch an Nagern gewonnen wurden [5].

In anderen dopaminergen Bahnen, wie z.B. der mesolimbischen Bahn, sind bei PD - wenn auch weniger drastisch - ebenfalls Dopaminmangel und Zellverlust zu beobachten [194]. Daneben kommt es auch zur Degeneration nicht-dopaminerger Systeme, z.B. noradrenerger, serotonerger oder cholinerger Systeme (für detaillierte Darstellung siehe [3,162]). Dennoch scheint der Dopaminverlust für die motorische Symptomatik maßgeblich zu sein, was mehrere Beobachtungen nahelegen: (1) Es besteht eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der motorischen Symptome und der Höhe des DA-Verlustes, (2) Zerstörung der nigrostriatalen Bahn oder Blockade von DA-Rezeptoren ruft Parkinson-Symptome hervor und (3) pharmakologische Behandlungen, bei denen von außen DA zugeführt oder DA-Rezeptoren stimuliert werden, reduzieren die Symptomatik bei PD-Patienten deutlich [117].

1.3.2 Ätiologie

Von sekundärem Parkinsonismus ist die Rede, wenn für die beschriebene Symptomatik eine nachvollziehbare Ursache bekannt ist; zu den Auslösern zählen bestimmte Virusinfektionen, Aufnahme toxischer Substanzen (Manganverbindungen, Kohlenmonoxid, MPTP), vaskuläre Störungen oder die Behandlung mit Neuroleptika [55]. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle, bei denen Parkinsonsymptome festgestellt werden, handelt es sich jedoch um den echten Morbus Parkinson, auch idiopathische Parkinson-Krankheit genannt. Dessen Ätiologie ist trotz intensivster Forschungsanstrengungen nach wie vor nicht befriedigend geklärt. Es gibt inzwischen viele Hinweise darauf, daß bei PD mitochondriale Dysfunktionen auftreten, insbesondere im Komplex I der Atmungskette, die zu Defiziten im Energiemetabolismus der Neuronen führen [301,361,366]. Ferner spielen bei der Degeneration der dopaminergen Neurone mit großer Wahrscheinlichkeit sogenannte freie Radikale eine sehr wichtige Rolle. Das sind Substanzen, die chemisch hochreaktiv sind und verschiedenste Zellbestandteile nachhaltig schädigen; das massive Vorhandensein solcher Substanzen wird als oxidativer Streß bezeichnet [213]. Zwischen diesen Faktoren liegt möglicherweise eine enge Wechselwirkung im Sinne eines "Teufelskreises" vor, da einerseits oxidativer Streß die Atmungskettenaktivität hemmen kann und verringerte Aktivität der Atmungskette wiederum die Produktion freier Radikale begünstigt [361]. Der Dopaminstoffwechsel selbst stellt auch eine Quelle für freie Radikale

dar und trägt möglicherweise zur Degeneration nigrostriataler Neuronen bei [405], was - solange es nur in geringerem Maße über die Lebensspanne auftritt - Teil des normalen Alterungsprozesses ist. Schließlich ist noch zu erwähnen, daß (1) in den verbleibenden Neuronen der SN von PD-Patienten erhöhte Konzentrationen von Eisen gefunden wurden, welches die Produktion freier Radikale katalysieren kann [194], und daß (2) dopaminerge Neuronen beim Menschen durch Neuromelanin pigmentiert sind. Neuromelanin kann Eisen speichern und somit unschädlich machen, hat antioxidatives Potential, ist andererseits aber als ein Nebenprodukt des Katecholaminmetabolismus selbst am Entstehen freier Radikale beteiligt [194] und offenbar ein Faktor, dessen Anwesenheit die Zelldegeneration begünstigt [220]. Es ist evident, daß Neuromelanin, Eisen und oxidativer Streß sich wechselseitig beeinflussen, aber es läßt sich noch keine eindeutige Aussage darüber treffen, inwieweit diese Faktoren Ursache oder Ergebnis der Neurodegeneration sind (213,753).

Die entscheidende Frage, warum es bei manchen Personen zu einer so massiven neuronalen Degeneration kommt, daß Krankheitssymptome auftreten, bei anderen jedoch nicht, ist allerdings noch offen. Epidemiologische Studien haben gelegentlich auf mögliche äußere Einflußgrößen hingewiesen, z.B. Nahrung, die reich an tierischen Fetten ist [267], das Leben auf dem Land und Brunnenwasserkonsum, wobei die Befundlage zur Bedeutung dieser Faktoren für das Erkrankungsrisiko insgesamt uneindeutig ist [97,173,284]. In einigen Studien wurde gefunden, daß PD-Patienten überdurchschnittlich häufig Pestiziden ausgesetzt waren [126,173]. Hinsichtlich potentieller neurotoxischer Substanzen gibt es seit mehreren Jahren empirische Hinweise, daß Isoquinolin-Derivate Atmungskettenenzyme hemmen und durch Bildung freier Radikale dopaminerge Neurodegeneration verursachen können [233,278,308,309]; diese Stoffgruppe kommt natürlich sowohl im Gehirn als auch in Lebensmitteln vor [285]; allerdings erklärt die bloße Allgegenwart einer solchen Substanz noch nicht, warum nur bestimmte Personen PD bekommen.

Die Suche nach genetischen Mechanismen in der Ätiologie von PD blieb lange Zeit sehr unergiebig: Mehrere Studien, in denen vor allem ein- und zweieiige Zwillinge verglichen wurden, erbrachten Resultate, die eher gegen eine Rolle der Vererbung sprachen, so daß diese Möglichkeit zeitweilig relativ unbeachtet blieb (Überblicksarbeiten: [110,170,315,440]). Polymeropoulos et al. machten dann aber 1997 die Entdeckung, daß in einer von ihnen untersuchten Großfamilie eine Mutation im Gen für α-Synuclein vorlag, die zu früh ausbrechendem PD führt [334,335]. Im Zuge dieser Entdeckung wurden dann weitere Gene (Parkin [227,314,406]; Ubiquitin [260]) bzw. Assoziationen von PD mit bestimmten Chromosomenabschnitten [160,457] oder Polymorphismen (Monoamin-Oxidase B [242]; α_1-

Antichymotrypsin [463]; Review: [66]) entdeckt. Die Wirkungsweise dieser Mutationen ist noch weitgehend ungeklärt. α-Synuclein ist jedoch als ein wichtiger Bestandteil der Lewy-Körper identifiziert worden [400]; das mutierte Protein aggregiert leichter als das Wildtyp-Protein [112], kann *in vitro* (programmierten) Zelltod auslösen [320], und Zellen, die mutiertes α-Synuclein enthalten, sind auch anfälliger für oxidativen Streß [324]. Eine Annahme ist, daß möglicherweise Chaperone, also Proteine, die die räumliche Ausbildung anderer Proteine beeinflussen, am Entstehen solcher Aggregate beteiligt sind [171,454]. Die Entdeckung von α-Synuclein ist sehr bedeutsam, da hiermit erstmalig eine Einzelmutation identifiziert wurde, die zum Entstehen von PD führt. Allerdings ist sie praktisch von geringer Bedeutung, da diese spezifische Mutation nur einige wenige Krankheitsfälle in ganz bestimmten Familien ("familiäre Form"), nicht aber das Gros der idiopathischen Parkinson-Erkrankungen erklären kann ("sporadische Form").

Etliche Autoren gehen inzwischen davon aus, daß bei der sporadischen Form von PD nicht entweder nur Umwelt- oder nur genetische Variablen ätiologisch relevant sind, sondern daß eine Interaktion von genetischen und Umwelteinflüssen stattfindet. Demnach wäre das individuelle Risiko, an Morbus Parkinson zu erkranken, bedingt durch das Zusammenwirken verschiedener externer (z.B. Umweltgifte, Infektionen) und interner Noxen (z.B. Dopaminstoffwechsel, Isoquinoline) sowie der ererbten Disposition, die Auswirkungen solcher Noxen auf dopaminerge Neuronen zu kompensieren [66,116,213,230,246,285,299,308,361]. Eine kürzlich veröffentlichte und sehr umfassende Studie, in der fünf Kandidatengene untersucht wurden, die überwiegend in Zusammenhang mit körpereigenen Entgiftungsmechanismen gesehen werden, ergab allerdings in keinem Fall eine signifikante Assoziation von Polymorphismen mit dem Auftreten von PD [311], so daß die Suche nach etwaigen Mechanismen weiterhin offen bleibt.

Eine mögliche genetische Disposition muß auch nicht auf das nukleäre Genom beschränkt sein, sondern es scheinen nach anderen relativ neuen Befunden auch Mutationen in der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure (DNS), die nur maternal vererbt wird und in der viele Atmungskettenenzyme kodiert sind, eine Rolle zu spielen [412,461].

1.4 Das MPTP-Modell für Morbus Parkinson

1.4.1 Entdeckungs- und Entstehungsgeschichte

Im Zeitraum von etwa 1979-82 wies in Kalifornien plötzlich eine Reihe von jungen Menschen alle klassischen Symptome des Morbus Parkinson auf, einer Krankheit, die normalerweise erst bei Menschen im höheren Lebensalter zu finden ist. Das Besondere bei diesen Patienten war darüber hinaus, daß sich die Symptomatik innerhalb weniger Tage voll entwickelt hatte. Sie sprachen zudem gut auf die Dopamin-Substitutions-Therapie mit L-Dopa, der gängigsten Therapie für PD, an. Dies ließ die Vermutung zu, daß den motorischen Defiziten bei diesen Personen - wie bei der idiopathischen Erkrankung - ein Dopaminmangel zugrunde liegt. Es ist in erster Linie einem Wissenschaftlerteam um den Neurologen William Langston zu verdanken, daß das Auftreten dieser mysteriösen Fälle von Parkinsonismus relativ schnell aufgeklärt wurde: Die betroffenen Personen hatten sich, meist intravenös, die synthetische Droge 1-Methyl-4-Phenyl-4-propionoxy-piperidin (MPPP) verabreicht. Diese stammte aus illegalen Hinterhoflaboren und war mit dem Nebenprodukt 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) verunreinigt (Abb. 2).

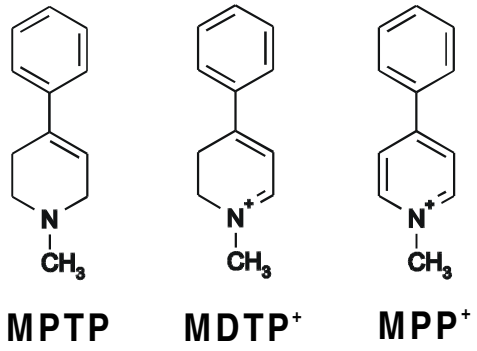

Abb. 2. Chemische Strukturformeln von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) sowie seinen Metaboliten 1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium ($MPDP^+$) und 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+)

Von dieser Substanz wurde dann vermutet, daß sie die Parkinson-Symptomatik ausgelöst hatte [95,246,247]. Sehr rasch wurde die neurotoxische Wirkung von MPTP in einer großen Zahl von Tierexperimenten näher untersucht. Zu den untersuchten Tierarten gehören z.B. verschiedene Affenarten [54,107,193,422], Ratten [44,212], Mäuse [189], Katzen [150], Frösche [23], Goldfische [469] oder Minischweine [290]. Dabei konnten in diesen Spezies parkinsonartige

Verhaltensdefizite sowie neurale Schädigungen, die schwerpunktmäßig das nigrostriatale System betreffen, nachgewiesen werden. Auch für Menschen, die eine MPTP-Vergiftung erlitten haben, ist mittlerweile neben der Charakterisierung der Symptomatik [251,423,458] neuropathologisch [250] oder mittels hochauflösender Positronen-Emissionstomographie [391] belegt, daß die Symptome tatsächlich mit einer Degeneration des nigrostriatalen Systems einhergehen. Diese Entdeckungen stellten eine Sensation dar, denn damit war eine Substanz bekannt geworden, die - von außen zugeführt - Parkinsonismus auslösen kann.

1.4.2 Wirkungsweise

Die Entdeckung der Wirkung von MPTP als Neurotoxin und sein Einsatz in Tiermodellen hat das Wissen um die molekularen Vorgänge bei der Degeneration dopaminerger Neurone stark vermehrt. Bei der Aufklärung der neurotoxischen Mechanismen hat sich u.a. die Applikation von MPTP in der Maus als sehr nützlich erwiesen [192]. MPTP entfaltet seine Wirkung über eine Vielzahl von Schritten (Abb. 3).

Gewöhnlich wird MPTP systemisch verabreicht; das Molekül ist lipophil und kann deshalb die Blut-Hirn-Schranke leicht überwinden. Im Gehirn wird MPTP in Gliazellen durch das Enzym MAO-B zu 1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium ($MPDP^+$) umgewandelt. Dieses wird - wahrscheinlich durch Ubiquinon [382] - zum eigentlich toxischen Molekül 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) oxidiert.

Als polares Molekül kann MPP^+ nicht ungehindert in Zellen eindringen, sondern benötigt dazu einen Transportmechanismus. Aufgrund seiner hohen Affinität zum Plasmamembran-Dopamintransporter (DAT) wird es vornehmlich in dopaminerge Zellen transportiert. Innerhalb der Zelle kann MPP^+ entweder (1) im Zytosol verbleiben und dort mit verschiedenen Enzymen interagieren, (2) durch den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) in synaptische Vesikel oder (3) aktiv in Mitochondrien transportiert werden.

In den Mitochondrien hemmt MPP^+ den Komplex I und möglicherweise auch noch andere Enzyme der Atmungskette [214,300]. Dies führt einerseits zu verringerter Produktion von Adenosintriphosphat (ATP), einem Molekül, das für viele zelluläre Prozesse Energie bereitstellt [79,374], andererseits kommt es zu einer vermehrten Produktion an freien Radikalen, besonders Superoxid. Dieses kann zwar durch Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid abgebaut werden, es können dann jedoch wiederum aggressive Hydroxylradikale entstehen.

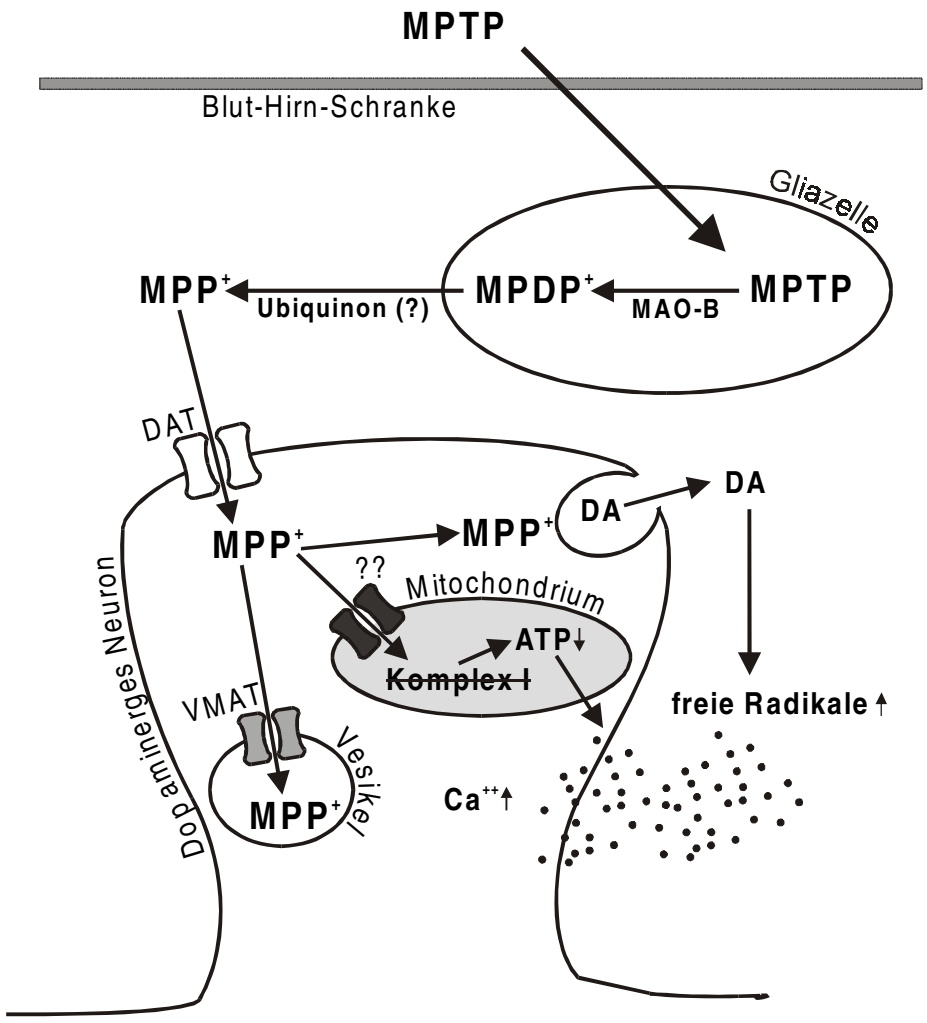

Abb. 3. Schema wichtiger MPTP-Wirkungmechanismen. Dargestellt sind der Weg von MPTP aus der Blutbahn ins Gehirn, seine Umwandlung zum neurotoxischen MPP^+ und wichtige neurotoxische Wirkungen von MPP^+ in einer dopaminergen Nervenzelle. ATP = Adenosintriphosphat; Ca^{++} = Kalzium; DA = Dopamin; DAT = Membran-Dopamintransporter; MAO-B = Monoamin-Oxidase B; MPTP = 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin; $MPDP^+$ = 1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium; MPP^+ = 1-Methyl-4-phenylpyridinium; VMAT = vesikulärer Dopamintransporter; ?? = nicht identifizierter Transportweg. Ein kleiner aufwärts gerichteter Pfeil hinter einem Substanznahmen zeigt einen Konzentrationsanstieg, ein abwärts gerichteter Pfeil einen -abfall an. Der durchgestrichene Name des Atmungsketten-Komplexes I symbolisiert dessen Hemmung durch MPP^+. Nähere Erläuterungen im Text.

Superoxid kann aber auch mit Stickstoffmonoxid (NO) zum hochreaktiven Peroxynitrit reagieren. Das Übermaß freier Radikale wird möglicherweise auch noch dadurch verstärkt, daß MPP^+ akut eine massive DA-Freisetzung aus den nigrostriatalen Nervenendigungen bewirkt; das DA wird im synaptischen Spalt enzymatisch und nicht-enzymatisch metabolisiert, was ebenfalls vermehrt freie Radikale produziert [71]. Die freien Radikale sind so reaktiv, daß sie

nahezu alle konstituierenden Zellbestandteile, wie Lipide, Proteine, Zucker und DNS schädigen und so zu verringerter Funktionsfähigkeit der Zelle bis zum Zelltod führen können. Die Schädigung von DNS wiederum aktiviert Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, was offenbar einen Reparaturmechanismus darstellt; dieser ist jedoch energiekonsumierend, was zur weiteren Entleerung intrazellulärer Energiespeicher führt [79,272]. Ein weiterer Weg, auf dem eine Schädigung der Zelle stattfinden kann, ist wahrscheinlich Kalzium-vermittelt; der genaue Wirkungsweg ist nicht geklärt, aber es wird diskutiert, daß MPP+ entweder direkt N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptoren aktiviert oder daß dies durch Membrandepolarisation aufgrund des ATP-Mangel geschieht. Dies resultiert in einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{++}-Konzentration, was wiederum zelltoxisch wirkende Kaskaden anspricht (sogenannte Exzitotoxizität) [50,59,219,395].

Es gibt Hinweise darauf, daß es bei sehr starker Schädigung zu Nekrose kommt, während bei mäßiger Schädigung Apoptose in Gang gesetzt wird (für weitere Details siehe [162,336,337]). Die letztere Möglichkeit scheint im Gegensatz zu der Neurodegeneration bei PD zu stehen, denn bei der humanen Krankheit gibt es keine schlüssigen Hinweise auf eine Beteiligung von Apoptose [53,462], was aber auch durch methodische Probleme bedingt sein könnte [52].

Das Auftreten von Lewy-Körpern, einem pathologischen Merkmal von PD, ist nach MPTP-Gabe bisher nicht schlüssig gezeigt worden, es wurden aber beim Affen Lewy-Körper-ähnliche Strukturen festgestellt [133]. Ein weiterer Unterschied zu PD besteht darin, daß die Degeneration nach Beendigung der Behandlung nicht progredient verläuft; allerdings gibt es doch vereinzelte Hinweise auf fortschreitenden Zellverlust nach MPTP-Aufnahme beim Menschen [250,391].

Davon abgesehen, verdeutlicht der Vergleich der MPTP- bzw. MPP^+- Wirkung mit den vermuteten Prozessen bei humanem PD (siehe 1.2), daß es sehr viele Gemeinsamkeiten gibt, und tatsächlich ist die Hypothesenbildung durch die am MPTP-Modell gewonnenen Erkenntnisse stark angeregt worden, so daß das MPTP-Modell als ausgezeichnetes experimentelles Modell für PD angesehen wird [336,337]. Angesichts dieser Parallelen lag sogar die Vermutung nahe, daß ein Teil der Morbus Parkinson-Fälle durch in der Umwelt vorhandenes MPTP hervorgerufen sein könnte; dies ist aller Wahrscheinlichkeit aber nicht der Fall, denn ein Nachweis der Substanz in der Umwelt gelang nicht [172]. Interessanterweise sind aber die bereits erwähnten Kandidaten aus der Stoffgruppe der Isoquinoline strukturell mit MPTP verwandt.

1.4.3 Neuronale Veränderungen nach MPTP-Gabe in der Maus

Die folgenden Ausführungen zu neuronalen Veränderungen infolge von MPTP-Gabe beziehen sich auf die Spezies Maus. Ein verbreitetes Verfahren zur *post mortem* Bestimmung der Konzentration von Monoaminen von Hirngewebe stellt die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie dar. Mit dieser Methode wurde in einer großen Anzahl von Arbeiten dokumentiert, daß MPTP-Gabe zu einer Reduktion der Dopamin-Konzentration im Neostriatum führt (z.B. [17,40,46,120,188,189,203,283,303,307,410], siehe außerdem die in Tabelle 1 zitierten Studien). Der DA-Verlust variiert stark zwischen den verschiedenen Studien und ist auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten, d.h. von Stunden bis zu Monaten nach der Behandlung, ermittelt worden. Mehrere Arbeiten legen nahe, daß das Ausmaß des Transmitter-Verlustes (Depletion) u.a. von der MPTP-Dosis abhängig ist [166,396,407,410,418]. Auch Konzentrationsabnahmen der Dopamin-Metaboliten 3-MT, DOPAC und HVA wurden regelmäßig beobachtet, allerdings fallen diese Reduktionen in der Regel nicht so drastisch aus wie die von Dopamin selbst. Daher ist häufig eine Erhöhung der Metaboliten/DA-Verhältnisse festgestellt worden, was im Sinne eines kompensatorischen Anstiegs der residualen DA-Aktivität interpretiert wurde [377,470].

Die Quantifizierung des Zellverlustes von dopaminergen Neuronen wird in der Regel vorgenommen, indem dopaminerge Neuronen durch eine TH-immunhistologische Färbung markiert werden (TH ist dasjenige Enzym im DA-Syntheseweg, das für die Syntheserate kritisch ist [210]). Die Anzahl der so markierten Neuronen wird unter dem Mikroskop gezählt und mit Werten von Kontrolltieren verglichen. Auch wenn in einigen Arbeiten gelegentlich keine Wirkung von MPTP auf der nigralen Ebene gefunden wurde [40,459], läßt sich inzwischen doch mit Sicherheit feststellen, daß MPTP-Gabe auch in der Maus zu teilweise beträchtlichem Verlust von dopaminergen Neuronen in der SN führen kann [17,36,120,184,189,211,296,307,410]. Auch anhand anderer Parameter wurde MPTP-Neurotoxizität nachgewiesen, z.B. wurde in einigen Untersuchungen gezeigt, daß nach MPTP die Dichte von TH-positiven Fasern im Striatum [296,353] oder die striatale TH-Aktivität [9,283,407] abnahmen. Manche Studien, die sich mit dem zeitlichen Verlauf der Neurodegeneration beschäftigt haben, wiesen in einigen Parametern Erholung nach, z.B. nahm innerhalb eines Zeitraums von Wochen bis Monaten die Dopaminkonzentration im Striatum wieder zu [9,296,450,459] und stieg die Dichte TH-immunreaktiver Fasern wieder an [459].

Neben der beschriebenen Schädigung der nigrostriatalen Bahn können - meist in geringerem Ausmaß - auch andere dopaminerge Systeme betroffen sein, wie z.B. die mesolimbische

Bahn, charakterisiert durch Zellverlust in der VTA [166,211,261] und Reduktion der DA-Konzentration in Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium [9,203,407]. Auch im Frontalkortex [200,418] wurde DA-Verlust gefunden, und es kann auch zu Veränderungen bei anderen Monoaminen, wie Adrenalin, Noradrenalin (NA) und Serotonin (5-HT, 5-Hydroxytryptamin) [46,93,200,202,294,410] oder gar Zellverlust [415] in weiteren Hirnregionen kommen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, daß MPP^+ auch eine Affinität zu anderen Monoamin-Transportern besitzt [7]. Schließlich soll noch erwähnt werden, daß bei systemischer MPTP-Applikation auch periphere Änderungen in Monoaminspiegeln zu finden sind, z.B. im Herz oder der Nebenniere [8,151,153,270].

Zusammenfassend läßt sich jedoch festhalten, daß die gravierendsten Auswirkungen in mesostriatalen und mesokortikolimbischen dopaminergen System auftreten. Aufgrund ihrer umfangreichen Analyse der neuronalen Degeneration kommen German et al. [166] zu der Aussage, daß bei der Maus nach MPTP-Behandlung dopaminerge Mittelhirnneuronen in den gleichen Kerngebieten degenerieren wie bei Menschen mit PD, eine Feststellung, die den Wert dieses Tiermodells erneut unterstreicht. Allerdings ist auch zu sagen, daß das Auftreten von Lewy-Körpern in verbliebenen Neuronen bei MPTP-behandelten Mäusen - im Gegensatz zur humanen Parkinson-Erkrankung - nach Kenntnisstand des Autors noch nicht beobachtet worden ist.

1.4.4 Verhaltensänderungen nach MPTP-Gabe in der Maus

In diesem Abschnitt werden Herangehensweisen vorgestellt, mittels derer in der Maus Verhaltensdefizite nach MPTP-Gabe in früheren Studien gemessen worden sind. Gleichzeitig werden entscheidende Versuchsbedingungen und wichtige Ergebnisse referiert. Da zu den MPTP-bedingten Verhaltensänderungen bislang keine Überblickarbeiten existieren (im Gegensatz zu neuronalen Mechanismen, für die bereits einige ausgezeichnete Reviews vorliegen [162,336,337]), ist dieser Abschnitt sehr ausführlich angelegt.

1.4.4.1 Allgemeine Beobachtungen

Nach MPTP-Gabe ist eine Reihe von akuten Verhaltensänderungen beobachtet worden; der Begriff "akut" bezieht sich hier und im folgenden auf Ereignisse unmittelbar nach bis hin zu mehreren Stunden nach der Behandlung (im Sinne von [263]). Mit Ausnahme einiger weniger Ratings fanden diese Beobachtungen jedoch für gewöhnlich unsystematisch, ohne weitere Quantifizierung statt. Zu den beschriebenen Phänomenen zählen der Straub-Schwanz (ein

charakteristisch nach oben gerichteter, steifer Schwanz) [263,294,306,353,473,473], Sträuben der Behaarung [42,43,46,263,294,353], erhöhter Speichelfluß [42,43,263,294,349], verstärkte Atemtätigkeit [42,43,294], verringerter Muskeltonus [46], erhöhte Reaktivität auf externe Reize [263] und Zähneklappern [263,349]. Diese Symptome können bereits wenige Minuten nach einer MPTP-Injektion auftreten und verschwinden in der Regel innerhalb von ein paar Stunden. Obwohl die genauen Mechanismen, die zur Ausbildung dieser Erscheinungen führen, noch nicht bekannt sind, gibt es Vermutungen, daß die Symptome auf akute Veränderungen nicht nur in DAergen, sondern auch in noradrenergen (Sträuben der Behaarung, Speichelfluß) und serotonergen Neurotransmittersystemen (Straub-Schwanz) zurückzuführen sind [263]. Tatsächlich wurde eine starke Freisetzung von 5-HT im Neostriatum bereits kurze Zeit nach Verabreichung von MPTP festgestellt, und die Gabe unspezifischer 5-HT-Rezeptorantagonisten verhinderte das Auftreten des Straub-Schwanzes [294].

1.4.4.2. Akinesie/Hypokinesie/Bradykinesie

Die in der Überschrift genannten Begriffe sind eng miteinander verknüpft und bezeichnen die herausragende negative Symptomatik bei Parkinsonismus, nämlich die verringerte motorische Aktivität. Die Übersetzung für "Akinesie" lautet etwa "Bewegungslosigkeit". Allerdings sind Menschen wie Tiere mit einem Parkinson-Syndrom - abgesehen von Extremzuständen -nicht vollkommen bewegungslos; daher bezeichnet dieser Terminus bereits die beeinträchtigte Fähigkeit, Bewegungen zu initiieren. "Bradykinesie" weist auf die Tatsache hin, daß Bewegungen in Individuen mit Parkinsonismus langsamer als in gesunden Kontrollen ablaufen können. Die Bezeichnung "Hypokinesie" wiederum wird verwendet, um den generellen Mangel an Bewegungen zu kennzeichnen.

Akinesie- und Katalepsie-Tests

Tests zur Messung von Akinesie und Katalepsie können zu den "einfachen" neurologischen Tests gezählt werden. Beim Akinesie-Test wird das Tier auf eine flache Oberfläche gelegt und gemessen, nach welcher Zeitspanne es alle vier Gliedmaßen bewegt hat. Im Gegensatz zu einfacher, "passiver" Akinesie ist unter Katalepsie die massiv erschwerte Fähigkeit zu verstehen, eine von außen (durch den Experimentator) auferlegte, unnatürliche Körperhaltung zu beseitigen [355]. In der Regel läuft der Test so ab, daß die Vorder- oder Hinterbeine des Tieres auf einen kleinen Block oder eine vertikale Stange, die sich einige Zentimeter über dem Boden befinden, gelegt werden. Wiederum wird dann die Zeit bestimmt, die das Tier benötigt,

um die Gliedmaßen zurückzuziehen und so eine physiologischere Körperhaltung einzunehmen; in gesunden Mäusen findet dies praktisch ohne Verzögerung statt. Eine Forschergruppe stellte mit den beschriebenen Tests einerseits einen deutlichen Anstieg der Akinesie-Latenzen 3.5 und 7 Stunden nach MPTP-Behandlung fest, wobei der striatale DA-Verlust ca. 40% betrug [294], und andererseits auch erhöhte Katalepsie-Latenzen nach 3.5 Stunden [306]; auch eine weitere Arbeitsgruppe beobachtete Akinesie und Katalepsie [385]. Im Gegensatz dazu fanden andere keinerlei Anstiege in den Latenzen bei einem MPTP-Dosierungsschema, das sogar DA-Depletionen (Transmitter-Verlust in % der Kontrollen) um 85% hervorrief [459]. In weiteren Arbeiten wurden Defizite nur dann beobachtet, wenn MPTP zusammen mit Diethyldithiocarbamat (DDC) [292] oder seinem Derivat Maneb [417] - beides Substanzen, die die MPTP-Neurotoxizität erhöhen können - verabreicht wurde. Weihmuller und Mitarbeiter berichteten, daß eine zusätzliche Stimulation durch ein kurzes Bad in kaltem Wasser oder eine Verabreichung von DA-Rezeptorantagonisten (Haloperidol) erforderlich war, um das Verhalten von Mäusen in diesen Tests meßbar zu beeinträchtigen [449,451]. Mit diesem Vorgehen waren die Autoren dann jedoch in der Lage, motorische Einschränkungen noch nach 5 Monaten zu finden, obwohl die neostriatalen DA-Konzentrationen innerhalb dieser Zeitspanne bereits wieder das Niveau der Kontrolltiere erreicht hatten [450]. Außerdem bewirkte die Gabe von GM_1-Gangliosid, einer Substanz, für die neurorestauratives Potential diskutiert wird, eine Unterdrückung von Verhaltensdefiziten [452], wobei jedoch eine kontinuierliche Verabreichung erforderlich war, um den Effekt aufrechtzuerhalten [453]. In der letztgenannten Studie war der Dopamin-Gehalt im Striatum zudem hoch negativ mit dem Haloperidol-induzierten Verhaltensdefizit korreliert. Ein weiterer Hinweis darauf, daß Akinesie auf verminderte DA-Konzentrationen im Striatum zurückzuführen ist, stammt aus dem Befund, daß sie durch gleichzeitige Gabe des DA-Agonisten Apomorphin (APO) verhindert werden kann [294].

Offenfeld

Das Offenfeld ist zweifellos der am häufigsten angewandte Verhaltenstest, um Verhaltensänderungen nach MPTP in der Maus zu messen. Es handelt sich dabei um eine einfache Arena, in die das Tier gesetzt wird und die durch ihre Neuheit dessen Erkundungsaktivität erhöht. In fast allen Studien besteht das Meßprinzip darin, daß ein Infrarotstrahl-Lichtschrankensystem im Offenfeld installiert ist, meist in zwei Lagen, um sowohl horizontale (Lokomotion = Fortbewegung) als auch vertikale Aktivität (Aufrichten) als Unterbrechung der Strahlen erfassen zu können. Entsprechende Software erlaubt in der Regel die Berechnung einer ganzen Reihe von Parametern wie "Gesamtzeit der Fortbewegung", "zurückgelegte Strecke", "Anzahl der

Aufrichtungen", "Aufenthaltszeit im Zentrum" und andere. Wie Tabelle 1 ausweist, die die Hauptergebnisse von fast 50 derartigen Arbeiten zusammenfaßt, lassen sich verschiedenartige Typen von Ergebnissen unterscheiden. Ein exakter Vergleich ist problematisch, weil sich die Studien teilweise in sehr vielen Punkten unterscheiden, z.B. bezüglich Alter, Stamm, Geschlecht, MPTP-Dosis, Dosierungsschema, Verabreichungsweg, Größe und Form des Offenfelds, Versuchsdurchgangsdauer, Testwiederholung, Dauer der Habituation an das Offenfeld vor dem Testdurchgang und Intervall zwischen MPTP-Injektion und Testung. Zusätzlich ist der striatale Dopamingehalt, der ein neurochemisches Standardmaß für den Grad der Schädigung darstellt, in den meisten Studien zwar bestimmt worden, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Testung. Dennoch sollen einige Trends in den Ergebnissen angesprochen werden:

In der Mehrzahl der Studien wurde ein Rückgang von Lokomotion und/oder Aufrichten nach einer Läsion mit MPTP festgestellt, was im Sinne einer Hypokinesie interpretiert werden kann. Dies wurde sowohl bereits 30 Minuten nach MPTP-Injektion beobachtet [332], teilweise aber auch nach langen Zeiträumen von bis zu 40 Wochen [136]. In einer anderen Teilgruppe von Arbeiten fand sich bei den MPTP-behandelten Mäusen anfänglich ein Rückgang der motorischen Aktivität, anschließend jedoch eine Erholung von diesen Defiziten. Einige wenige Forscher fanden keine Veränderungen; eine denkbare Erklärung wäre, daß die Testung hier zu einem Zeitpunkt stattgefunden haben könnte, an dem die funktionale Erholung bereits abgeschlossen war. In anderen Arbeiten wiederum erschienen die Tiere *hyper*aktiv, und bei einigen konnte ein Muster beobachtet werden, das in der Tabelle mit "Überschießende Erholung" betitelt wurde: Auf einen Rückgang der Lokomotion folgte ein Aktivitätsniveau, das über demjenigen der Kontrollen lag.

Hinsichtlich des Ausmaßes der funktionalen Beeinträchtigung konnte klar gezeigt werden, daß dieses *innerhalb* einer Studie dosisabhängig ist [136,332,414]; z.B. verabreichten Fredriksson und Archer Gruppen von Mäusen jeweils eine unterschiedliche MPTP-Dosis [136]. Bei der Testung im Offenfeld sowohl drei Wochen als auch drei Monate danach zeigten sich funktionale Defizite, die mit steigender Dosis drastischer ausfielen; dieses Ergebnismuster deckte sich zudem gut mit dem Ausmaß der jeweiligen striatalen Dopamin-Reduktion. Im Gegensatz dazu sind derartige Beziehungen beim Vergleich *zwischen* Studien unterschiedlicher Autoren weniger eindeutig. Beispielsweise benutzten sowohl Tomac et al. [427] als auch Fredriksson et al. [143] dasselbe MPTP-Dosierungsschema in demselben Stamm (C57BL/6) und erzielten sehr ähnliche DA-Depletionen (über 80%); bei den erstgenannten Autoren zeigte sich jedoch 5 Tage nach MPTP keine Änderung der motorischen Aktivität, wogegen letzte-

re massive Defizite noch nach drei Wochen fanden. Chia et al. [70] wiederum behandelten den gleichen Stamm (die Tiere waren hier allerdings 2-4 Wochen jünger) mit deutlich höheren Mengen an MPTP, produzierten dabei eine ähnlich hohe DA-Depletion wie die vorher zitierten Studien, beobachteten aber im Offenfeld erhöhte Lokomotion im Vergleich zu Kontrollen, die mit physiologischer Kochsalzlösung (KSL) behandelt worden waren. Diese Beispiele illustrieren, daß im MPTP-Mausmodell die gleiche Behandlung in verschiedenen Laboren nicht notwendigerweise zu den gleichen Defiziten führt und daß Aktivitätsänderungen im Offenfeld nicht vollständig anhand der striatalen DA-Depletion erklärbar sind. In diesem Zusammenhang sind mehrere Befunde interessant:

Einige Ergebnisse weisen darauf hin, daß neben Dopamin auch Serotonin am Grad der motorischen Aktivität beteiligt ist. Die Gewebekonzentrationen von 5-HT sind beispielsweise in SN, limbischem System, Kleinhirn und verlängertem Rückenmark nach einer einzelnen Dosis MPTP für drei Stunden erhöht [294], und auch der Serotonin-Metabolismus ist akut erhöht [70]. MPTP-induzierte Hyperaktivität konnte zudem durch gleichzeitige Gabe des serotonergen Neurotoxins 5,7-Dihydroxytryptamin (5,7-DHT) verhindert werden [69]. Es hat den Anschein, als ob in denjenigen Studien, die eine Hyperaktivität oder überschießende Erholung fanden, besonders hohe MPTP-Mengen oder zusätzliche Substanzen (Tropolon, Ethanol) verabreicht wurden oder die Verhaltenstestung besonders früh nach der Behandlung stattfand. Möglicherweise haben diese experimentellen Bedingungen einen entscheidenden Einfluß auf serotonerge Mechanismen bzw. lassen diese im Verhalten erkennbar werden.

Sundström et al. [408] berichten, daß bereits kleine Veränderungen in der Testprozedur oder Testumgebung das Ergebnis einer Offenfeldmessung nach MPTP kritisch beeinflussen können: Als diese Autoren nicht in der Lage waren, frühere Ergebnisse einer Hypokinesie zu replizieren [407], stellten sie fest, daß in der späteren Studie kein Transport der Tiere in einen anderen Raum vor der Testung vorgenommen wurde, und nahmen an, daß Transportstreß das Auftreten meßbarer Symptome entscheidend begünstigen kann. Dies deutet erneut auf einen Zusammenhang von Streß und dopaminerger (nigrostriataler) Aktivität hin. Es ist seit längerer Zeit bekannt, daß Streß auf dopaminerge Systeme wirkt und beispielsweise die DA-Ausschüttung in Striatum, Nucleus accumbens und medialem Frontalkortex erhöhen [2] oder auch zu präfrontaler DA-Dysfunktion und damit verbundenen Verhaltensdefiziten führen kann [298].

Abgesehen von den in Tabelle 1 aufgelisteten Unterschieden in den experimentellen Protokollen könnten noch weitere, unkontrollierte Faktoren ausschlaggebend und an der Bandbreite der Resultate beteiligt sein. Zum Beispiel fanden Sershen, Hashim und Lajtha [377] Langzeit-

Defizite in der Lokomotion bei MPTP-behandelten Tieren nur in der Dunkel-, nicht aber in der Hellphase; der Zeitpunkt der Testung während des Tag-Nacht-Rhythmus könnte demnach eine derartige Einflußgröße darstellen.

Hinsichtlich der Dauer der Defizite gelang es der Gruppe um Fredriksson mit dem Offenfeld regelmäßig, deutliche und zeitlich stabile motorische Defizite Wochen oder Monate nach einer MPTP-Behandlung zu erfassen (z.B. [136,143,145]). Aus Tabelle 1 ist ein Trend erkennbar, daß in solchen Studien, die Langzeitdefizite (d.h. drei Wochen oder mehr nach MPTP) nachgewiesen haben, lange Beobachtungszeiten (60 Minuten oder mehr) im Offenfeld gewählt worden waren. Hinzu kommt, daß bei einer Reihe von Arbeiten Defizite in späteren Abschnitten der Testung ausgeprägter waren [49,136,143,145]. Daher kann vermutet werden, daß längere Beobachtungsdauer die Sensitivität des Offenfeldtests hinsichtlich MPTP-bedingter funktionaler Defizite erhöhen könnte. Ein anderer erfolgsversprechender Faktor scheint die explizite Messung des Aufrichtverhaltens zu sein, das sich bei vielen Autoren als ein sehr empfindlicher Parameter erwiesen hat [136,144,145,259,427].

Tabelle 1. Ergebnisse von Offenfeld-Studien nach MPTP-Behandlung

Quelle	**Behandlung** (Anzahl Injektionen x mg MPTP pro kg Körpergewicht/ Intervall zwischen Injektionen/Route)	**Stamm, Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Behandlung**	**Dopamin-Verlust im Striatum** (verglichen mit Kontrollen)	**Dauer des Versuchsdurchgangs** (in min.)	**Verhaltensergebnisse, angegeben in Tagen nach Behandlung** (L = Lokomotion; A = Aufrichten; in eckigen Klammern: zusätzliche Behandlungen, ↑=Anstieg, ↓=Rückgang der Aktivität verglichen mit der jeweiligen Gruppe, die nur mit MPTP behandelt wurde)
Hypoaktivität					
[17]	5 x 2 x 30 mg/ 1 d x 8 h/i.p.	C57BL, M, adult	69%	30	nach 10-20 d (keine exakte Angabe) L 72% reduziert
[45]	intrazerebrale MPP^+-Injektionen in Striatum oder SN	BKW, W, ?	Striatum: 86% SN: n.s.	20	L konsistent reduziert (~70%) nach Injektionen ins Striatum, aber nicht in die SN; Testung direkt nach Injektion und an drei darauffolgenden Tagen
[49]	2 x 2 x 10 oder 30 mg/1 wo x 16 h/i.p.	C57BL/6J, M, adult	?	60	nach 9 d L reduziert, aber nur in der zweiten Testhälfte
[62]	1 x 33.3 mg/-/s.c.	C57BL/6J, M, 12 wo	?	60	nach 7 d (?) L ~60% und A ~75% reduziert
[65]	intrazerebrale MPTP-Injektionen in die SN	BALB/c, M, 2-3 mo	49%	30	nach 7 d L ~40% reduziert
[68]	10 x 25 mg/24 h/i.p.	BALB/c, M, adult	71%	30	nach 7 d L ~ 25% reduziert [Deprenyl ↑]
[118]	1 x 30 mg/-/s.c.	C57BL/6, M, 3-4 mo	89%	60	nach 1 d L ~55% reduziert [Nicotin ↑,↓ dosisabhängig]
[119]	1 x 30 mg/-/s.c.	C57BL/6, M, 3-4 mo	88%	60	nach 1 d L ~60% reduziert [Cytisin ↑]
[121]	1 x 40 mg/-/s.c.	C57BL/6, M, 3 mo	94%	60	nach 1 d L ~85% reduziert [PBN ↑]
[136]	2 x 5-40 mg/16 h/s.c.	C57BL/6, M, 10 wo	0-90%	60	nach 3 wo und 3 mo L >55% und A >80% reduziert; dosisabhängig; stabile Defizite noch nach 40 wo; zweite Testhälfte ergab stärkere Defizite
[137]	2 x 40 mg/24 h/s.c.	C57BL/6, M, 6 mo	91%	180	nach 20 d L + A ~75% reduziert
[138]	2 x 30 mg/24 h/s.c.	C57BL/6, M, 10 wo	58%	30	nach 14 d L ~36% und A ~55% reduziert [PBN ↑]
[139]	2 x 0.3 oder 20 mg /24 h/oral	C57BL/6, M, 10 d	18% oder 40%	60	nach 60 d und 120 d L + A reduziert

[140]	2 x 40 mg/24 h/s.c.	C57BL/6, M, 10 wo	90%	180-1440	nach 3 wo L + A massiv reduziert [L-DOPA+NMDA-Antagonist ↑]
[141]	2 x 40 mg/16 h/s.c.	C57BL/6, M, 10 wo	?	120/180	nach 3 wo L ~90% und A ~85% reduziert [L-DOPA+NMDA Antagonisten ↑]
[142]	2 x 40 mg/24 h/s.c.	C57BL/6, M, 6 mo	81%§	120	nach 4 wo L und A massiv reduziert [Antikonvulsiva+L-DOPA ↑]
[143]	2 x 40 mg/24 h/s.c.	C57BL/6, M, 10 wo	83%§	180	nach 3 wo L ~80% und A ~75% reduziert; spätere Testabschnitte ergaben stärkere Defizite [L-DOPA ↑, wearing-off]
[144]	2 x 40 mg/16 h/s.c.	C57BL/6, M, 10 wo	91%	180	nach 2 wo L ~45% und A ~80% reduziert [D_1+D_2 Agonisten ↑]
[145]	2 x 40 mg/16 h/s.c.	C57BL/6, M, 10 wo	88%	270	nach 12 wo L 55% und A 83% reduziert innerhalb der ersten 60 min; zweite Hälfte dieser Zeit ergab stärkere Defizite [L-DOPA ↑]
[161]	5 x 2 x 30 mg/ 1 d x ? h/i.p.	H, M, ?	?	10	nach 7 d L reduziert, aber A erhöht [Angiotensin II ↑]
[257]	7 x 30 mg/24 h/i.p.	BALB/c, M, 2-3 mo	30%	30	nach 7 d L ~35% reduziert
[259]	1 x 30 mg /-/s.c. 1 x 50 mg /-/s.c.	CD-1, M, ?	?	480	kurz nach Injektion L für 2 h und A für 6 h reduziert nach MPTP 1 x 30 mg; L erhöht nach MPTP 1 x 50 mg
[332]	1 x 1.8-45 mg /-/i.p.	C57BL/6 und OF1, M, ?	?	10	nach 30 min in beiden Stämmen L 11-60% reduziert, dosisabhängig [MAO-B-Hemmer ↑]
[377]	2 x 25 mg/24 h/s.c.	BALB/cBy, W, 3 mo und 22 mo	55-60%	1440	nach 2 wo und 2 mo L reduziert, aber nur in der Dunkelphase; Testung in Gruppen von drei Mäusen pro Käfig
[383]	5 x 30 mg/24 h/i.p.	C57BL/6, M, ?	?	30	nach 30 min L ~85% reduziert [KW-6002 ↑]
[407]	2 x 40 mg /16 h/s.c.	C57BL/6, M, 10 wo	80%	30	nach 4 wo L 66% und A 79% reduziert [L-DOPA ↑]
[417]	(Maneb+) 1 x 50 mg/ -/i.p.	Swiss-Mäuse, M, ?	?	60	direkt nach Injektion L reduziert, aber nur signifikant bei kombinierter Gabe mit Maneb (~60%)
[427]	2 x 40 oder 50 mg/ 24 h/s.c	C57BL/6, M, 11-12 wo	87% nach MPTP 2 x 40 mg	60	MPTP 2 x 40 mg: nach 5 d L normal [nach GDNF Hyperlokomotion]; MPTP 2 x 50 mg: A 73% reduziert
[470]	DDC+ 2x15-37.5 mg/ 12 h/i.p	C57BL/6J, M, ?	>75% (ausgewählte Tiere)	2 x 240	Testung im Heimkäfig 4 h in Dunkel- und 4 h in Hellphase; nach 1 d L reduziert im Dunkeln, nach 3 d und 5 d L erhöht im Hellen

Erholung

[46]	6 x 30 mg/24 h/i.p. und (2 x 30 mg + 2 x 40 mg + 2 x 50 mg)/24 h/i.p.	C57BL/6 und BKW, M, ?	88% und 91%	60	nach 1 h L 93% oder 86% reduziert, danach normal (1 d, 2 d, 3 d, 4 d) in beiden Stämmen
[202]	akut: 1 x 40 mg/-/i.p. chronisch: 7 x 30 mg/ 24 h/i.p.	BALB/c, M, 2-3 mo	akut: 12% chronisch: 30%	akut: 15 chro-nisch: 30	akut: nach 1 h und 6 h L ~55% reduziert, aber nicht nach 12 h und 24 h chronisch: nach 28 d L ~20% reduziert
[292]	(DDC+) 2 x 30 mg/ 12 h/i.p.	C57BL/6, M, ?	?	3	nach 2 d L ~70% reduziert in MPTP+DDC, aber nicht in der MPTP Bedingung; nach 7 d normal
[294]	1 x 40 mg/-/s.c.	BALB/c, ?, adult	~60%	600	direkt nach Behandlung Sprungaktivität für 2 h, nach 3 h L ~100% reduziert, nach 48 h normal
[313]	10 x 30 mg/24 h/i.p.	C57BL, M, 7 wo	82%	1440	1-2 d nach Behandlung L reduziert, nach 7-10 d L normal
[378]	2 x 25 mg/18 h/s.c.	BALB/cBy, ?, 2-4 mo	28% (nach 13 wo)	1440	nach 1 wo L reduziert, nach 13 wo normal; Testung in Gruppen von drei Mäusen pro Käfig
[414]	1 x 10-30 mg/-/i.p.	ddY, M, ?	-29%§§ (nach 30 min)	120	direkt nach Behandlung L für 10-40 min dosisabhängig re-duziert, danach normal

Keine Änderungen der Aktivität

[209]	4 x 20 mg/2 h/i.p.	C57BL/6, M, 8-10 wo	90%	60	nach 3 d oder 18 d L normal
[365]	4 x 25 mg/2 h/i.p.	NMRI und C57BL/6, M, ?	?	?	nach 10 d spontane Bewegungsaktivität nicht verändert
[418]	3 x 30 mg/12 h/i.p.	C57BL/6wt, W, 5 mo	59%	0.83	nach 7 d L normal, aber MPTP-behandelte Mäuse verbrach-ten mehr Zeit im Zentrum des Offenfeldes

Hyperaktivität

[69]	10 x 40 mg/24 h/s.c.	C57BL/6, M, 2 mo	90%	30	nach 7 d L ~15% erhöht [5,7-DHT ↓]

[70]	10 x 20-45 mg/ 24 h/s.c.	C57BL/6, M, 2 mo	76-86%	30	nach 7 d L normal bis ~35% erhöht, dosisabhängig [5,7-DHT ↓]
[76]	3 x 10-30 mg/24 h/i.p.	BALB/c, M, ?	?	10	nach 1-3 d L erhöht, dosisabhängig
[232]	5 x 30 mg/24 h/i.p., gelöst in 20% Ethanol	SW, M, ?	0% nach 30 d	30	nach 3 d, 5 d, 7 d L ~35% erhöht, jedoch nicht nach 1 d
[329]	Tropolon+ 1 x 50 mg/-/ s.c.	NMRI, M, ?	0% (während der Testung) 55% (1 h später)	30	nach 30 min L 701% erhöht

Überschießende Erholung

[115]	13 x 30 mg/24 h/i.p.	C57BL, M, 1 mo	68%	2	nach jeder Injektion L erst mehrere Stunden reduziert, später dann über Normalniveau erhöht [GM_1-Ganglioside ↓]
[459,460]	10 x 30 mg/24 h/i.p.	C57BL, M, 8-9 wo	86% (0.5 h) 82% (24 h) 73% (7 d)	10	nach 30 min L und A reduziert, nach 24 h L ~10% erhöht; nach 7 d normal

§ nach chronischer L-DOPA-Gabe; §§ d.h. Anstieg über Kontrollniveau

Abkürzungen:

min = Minute(n); h = Stunde(n); d = Tag(e); wo = Woche(n); mo = Monat(e); i.p. = intraperitoneal; s.c. = subkutan; M = männlich; W = weiblich; 5,7-DHT = 5,7-Dihydroxytryptamin; DDC = Diethyldithiocarbamat; GDNF = aus Gliazell-Linien stammender neurotropher Faktor; KW-6002 = (E)-1,3-Diethyl-8-(3,4-dimethoxystyryl)-7-methyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion; NMDA = N-Methyl-D-Aspartat; PBN = α-Phenyl-tert-Butylnitron.

Anmerkungen:

In vielen Studien sind mehrere Experimente durchgeführt worden; um die Tabelle übersichtlich zu halten, wurden nur die Teile hier präsentiert, die für Offenfeldtestung am relevantesten erschienen. In etlichen Fällen wurde der Grad der motorischen Aktivitätsänderung oder des striatalen DA-Rückgangs anhand grafisch präsentierter Daten geschätzt, dies ist mit "~" gekennzeichet. Ein Fragezeichen "?" zeigt an, daß entsprechende Daten in der Originalpublikation nicht verfügbar war. Wenn in der Originalarbeit Dopamin-Verluste für mehrere Zeitpunkte angegeben wurden, ist in der Tabelle derjenige Wert zu finden, der zeitlich am nächsten zur Offenfeldtestung liegt.

Lesebeispiele für Rubrik "Behandlung":

2 x 40 mg/24 h/s.c. = 2 subkutane Injektionen zu je 40 mg MPTP/kg Körpergewicht im Abstand von 24 Stunden;

5 x 2 x 30 mg/1 d x 8 h/i.p. = an 5 aufeinanderfolgenden Tagen täglich jeweils 2 intraperitoneale Injektionen zu je 30 mg MPTP/kg Körpergewicht im Abstand von 8 Stunden.

Schwimm-Test

In einigen wenigen Studien wurde ein Schwimmtest eingesetzt, um motorische Beeinträchtigungen zu untersuchen. Dazu wurden Mäuse in ein kleines Wasserbecken gesetzt und ihr Verhalten beobachtet und per Rating-Skala quantifiziert (aktives Schwimmen versus passives Treiben). Eine Forschergruppe fand, daß MPTP nach sieben Tagen zu einem erhöhten Anteil von Episoden führte, in denen sich die Tiere nur treiben ließen [303,306], wogegen andere (bei sogar höherem DA-Verlust) eine derartige Beeinträchtigung zwar 30 Minuten, aber nicht 1 und 7 Tage später beobachteten [105]. Es ist einerseits fraglich, ob dieses Testverfahren zur Untersuchung sehr schwer lädierter Tiere geeignet ist, weil die Gefahr des Ertrinkens bestehen könnte. Auf der anderen Seite könnten relativ niedrige Wassertemperaturen - durch Streß-Induktion - Beeinträchtigungen in solchen MPTP-behandelten Tieren wieder wachrufen, deren Verhalten (z.B. im Heimkäfig) bereits erholt erscheint.

Pole-Test

Der Pole-Test[1] wurde 1985 eigens zur Erfassung von MPTP-bedingter Bradykinesie in der Maus entwickelt [317]. Er besteht aus einer vertikalen Stange, die mit einem griffigen Material beschichtet ist und an der Spitze einen kleinen Korkball trägt. Die Tiere werden mit dem Kopf nach oben direkt unterhalb der Spitze plaziert. Zwei Parameter haben Verwendung gefunden, um die Leistung zu beschreiben: Die Zeit, bis das Tier eine 180°-Wendung vollzogen hat, und die Zeit bis zum Betreten des Bodens mit allen vier Gliedmaßen. Unbehandelte Mäuse drehen sich im Regelfall innerhalb kürzester Zeit und erreichen den Grund typischerweise in ca. 20 Sekunden. MPTP-behandelte Tiere benötigen für beides wesentlich länger [17,419,420], was aber durch die zusätzliche Applikation des Dopamin-Vorläufers L-DOPA aufgehoben werden kann [317,318]. Die Verhaltensdefizite können auch durch andere Neurotoxine, die zu einem striatalen Dopaminmangel führen [221,233,280,281,420], oder durch Substanzen, die DA-Rezeptoren blockieren [231,319], produziert werden. Die Testparameter weisen zudem eine hohe Korrelation mit der striatalen Dopaminkonzentration auf [281], und da der Test relativ einfach, kostengünstig und schnell durchzuführen ist, scheint er gut geeignet sein, um bei Mäusen funktionelle Defizite nach nigrostriatalen Läsionen zu erfassen.

[1] Zu deutsch: Stangen-Test. Da die einschlägige Fachliteratur zu diesem Verfahren auf Englisch publiziert worden ist und vielfach englische Fachbezeichnungen auch in den deutschen Laborsprachgebrauch eingehen (wie im Fall des Pole-Tests geschehen), wird in dieser Arbeit zwecks Vereinfachung und leichter inhaltlicher Zuordbarkeit durchgehend der englische Ausdruck verwendet. Dies gilt auch für das später im Text genannte Testverfahren "Elevated Plus-Maze".

1.4.4.3 Tremor

In vielen Arbeiten wird phasischer Ganzkörper-Tremor als einer der Verhaltenseffekte nach MPTP berichtet, im Regelfall in der akuten Phase nach der Behandlung [42,43,46,65,183,202,294,306,353,452]. Gupta et al. beobachteten Tremor nur in älteren Mäusen [180], andere nur bei hohen MPTP-Dosen [161]. Quantifiziert wurde dieses Symptom jedoch nur äußerst selten; wenn visuelle Beobachtungen mittels Ratingskalen eingestuft wurden, wurde Tremor nach MPTP-Gabe festgestellt [306,385] bzw. wurden höhere Tremorwerte nach zusätzlicher Stimulation mit der Tremor-erzeugenden Substanz Oxotremorin in MPTP-behandelten im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren gefunden [443]. Physikalisch kann Tremor anhand seines Frequenzmusters erkannt werden: Lee und Lu haben MPTP-induzierten Tremor mittels eines kommerziell erhältlichen Tremor-Meßgerätes erfaßt, der aus einer Sensor-Fläche und einem nachgeschalteten Frequenz-Analysator bestand. Sie fanden dabei, daß sich Tremor - im Vergleich zu normalen Bewegungen - durch höhere Frequenzen auszeichnet. Anhand dieses Kriteriums zählten sie Tremor-Episoden und stellten noch eine Woche nach MPTP-Behandlung eine erhöhte Anzahl solcher Episoden fest [257].

1.4.4.4 Rigor

Noch weniger als Tremor ist Rigor im MPTP-Mausmodell untersucht worden. Zwar wird das Auftreten dieses Symptoms mehrmals erwähnt [65,180,202,306], aber insgesamt scheint es nicht hinreichend operationalisiert worden zu sein, denn trotz intensiver Recherchen ist dem Autor keine einzige Studie bekannt, in der eine Quantifizierung vorgenommen worden ist. In einer Arbeit wird angedeutet, daß nach einer MPTP-Behandlung möglicherweise nur die Hinterbeine oder diese wenigstens stärker als die Vorderbeine Rigor aufweisen [180].

1.4.4.5 Störungen von Gang, Haltung und motorischem Koordinationsvermögen

Gangstörungen

Mäuse können infolge einer MPTP-Behandlung Gangstörungen entwickeln, die sinngemäß etwa als "ataxisches Torkeln" beschrieben wurden [42,43]. Nach Wissensstand des Autors wurde dies bisher nur einmal mittels des Fußspuren-Tests untersucht: In diesem Test werden die Pfoten der Tiere mit Farbe präpariert und die resultierenden Gangmuster ausgewertet [25].

Bei einer solchen Analyse konnten verringerte Schrittlängen bei MPTP-behandelten Mäusen [111] und Ratten [431] nachgewiesen werden.

Störungen der Körperhaltung

Störungen der Körperhaltung, wie sie ja bei der humanen Parkinson-Krankheit regelmäßig beobachtet werden, finden sich auch im MPTP-Mausmodell [161]. Sie wurden meist als akute Reaktionen von nur kurzer Dauer beschrieben und mit Ausdrücken wie "bucklige Haltung" [473], "stärker gekrümmte Wirbelsäule" [407] oder "gespreizte Hinterbeine" [263,306] charakterisiert. In zwei Untersuchungen, in denen eine kombinierte MPTP+DDC-Behandlung durchgeführt wurde, fanden sich solche Symptome allerdings bis zu einer Woche [77,470]. Zudem wurde gefunden, daß bei augenscheinlich erholten MPTP-behandelten Mäusen nach einer pharmakologischen Blockade von DA-Rezeptoren mit Haloperidol derartige Haltungsstörungen wieder zu verzeichnen waren [452]. Eine systematische Beobachtung mittels Rating ergab, daß gespreizte Hinterbeine schon 10 Minuten nach MPTP auftraten; dies konnte durch gleichzeitige Gabe eines unspezifischen 5-HT-Rezeptorblockers verringert werden [294], was eine serotonerge Beteilung an diesem Symptom nahelegt.

Greif-Tests

Gesunde Mäuse zeigen spontanes Kletterverhalten, was zum Beispiel bei ihrer Beobachtung in einem Heimkäfig mit Drahtgitter deutlich erkennbar ist. Einige Forscher sind der Frage nachgegangen, ob dieses typische Verhalten als Folge einer MPTP-Behandlung beeinträchtigt sein kann. Dabei kamen einander ähnelnde Versuchsanordnungen zum Einsatz: Mäuse wurden entweder mit den Vorderpfoten an ein horizontal aufgespanntes Drahtseil gehängt ("traction test") [17], auf ein Seil ("string test") [349] oder ein vertikales Gitter gesetzt ("grip test") [76]. Die Zeitspanne, die die Tiere auf der Apparatur verweilen konnten, oder die Qualität des Greifens (Einsatz von Vorder-, Hinterpfoten oder Schwanz) wurden beurteilt, und in zwei der drei genannten Arbeiten stellten die Experimentatoren MPTP-bedingte Defizite fest.

Rotarod

Der Rotarod-Test, in dem Tiere sich durch entsprechende kompensatorische Bewegung auf einer rotierenden Walze halten müssen, ist ein weitverbreitetes Verfahren, um die Fähigkeit zu flexibler Bewegungskoordination zu messen [223]. Dieses Verfahren ist auch im MPTP-Mausmodell zum Einsatz gekommen. Es wurde gezeigt, daß die Zeit, die die Tiere erfolgreich auf der Walze verbleiben können, nach Verabreichung von MPTP verringert ist, gemessen

z.B. nach zwei Tagen [76], in einigen Arbeiten sogar nach mehr als drei Monaten [352,353]. Hierbei wurde außerdem eine hohe Korrelation zwischen der Leistung im Test und dem Ausmaß der verbleibenden striatalen TH-Immunoreaktivität gefunden [353]. Duan und Mattson berichten von einer verringerten Rotarodleistung 24 Stunden nach MPTP, verglichen mit einer Kontrollbehandlung (KSL); danach kam es zu einer allmählichen Erholung der Leistung. Der Test war zudem sensitiv genug, um zu zeigen, daß diese Erholung bei einer bestimmten neuroprotektiven Zusatzbehandlung (die den Verlust DAerger Zellen reduzierte) rascher erfolgte [108]. Walsh und Wagner waren nur bei zusätzlicher Oxotremoringabe kurz vor der Testung in der Lage, Leistungsunterschiede zwischen MPTP- und kontrollbehandelten (KSL) Mäusen festzustellen [443], einer Zusatzbehandlung, die vermutlich die motorische Koordinationsleistung weiter beeinträchtigt hat. Es hat den Anschein, daß relativ fordernde Testbedingungen erforderlich sind, z.B. durch pharmakologische Stimulation oder durch Parameter wie Drehgeschwindigkeit, Walzendurchmesser, Beschleunigung etc. (wie in weiter oben genannten Arbeiten angewendet), um mit dem Rotarod in MPTP-behandelten Mäusen ein Verhaltensdefizit nachweisen zu können. Dazu paßt, daß in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit [279] ältere Mäuse mit einem Transgen für humanes α-Synuclein Defizite auf einem *beschleunigenden* Rotarod zeigten (bei diesen Tiere wurde auch ein Rückgang der Anzahl TH-positiver Terminalen im Striatum gefunden).

1.4.4.6 Andere Symptome

Freß- und Trinkverhalten

In einer einzigen Studie, in der Trink- und Freßverhalten nach MPTP explizit untersucht wurden, ließ sich keine eindeutige Reduktion in diesen Verhaltensweisen nachweisen [232]. Dennoch gibt es mehrere Hinweise, daß MPTP das Ernährungsverhalten beeinflussen kann, was wiederum zu meßbaren Reduktionen des Körpergewichts der Mäuse führt [111,118,121,232]. Ähnliche Beobachtungen sind bei Ratten gemacht worden, bei denen mit dem katecholaminergen Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) bilateral nigrostriatale DA-Neuronen lädiert worden waren [371]. In schweren Fällen von Aphagie wurden Wasser und weiches Futter den Mäusen in unmittelbarer Nähe zum Körper zur Verfügung gestellt, um die Nahrungsaufnahme zu erleichtern und die Wahrscheinlichkeit der Mortalität zu vermindern [180,292].

Drehverhalten

Eine Arbeit aus der Mitte der achtziger Jahre hat das Drehverhalten von Mäusen untersucht, bei denen eine unilaterale Läsion des nigrostriatalen Systems durch MPTP-Infusion in das rechte Striatum vorgenommen worden war [154]. Fünf Tage nach der stereotaktischen Behandlung wurde den Tieren Amphetamin (AMPH) i.p. injiziert und anschließend die Anzahl von ganzen Drehungen ipsi- und kontralateral zur geschädigten Hemisphäre erfaßt. Der Nettowert ipsilateraler Drehungen (ipsi- minus kontralaterale Drehungen) war im Vergleich zu Tieren, die nur eine Infusion mit physiologischer Kochsalzlösung erhalten hatten, erhöht. Dies wird dadurch erklärt, daß AMPH im unlädierten Striatum (aufgrund der absolut höheren Anzahl DAerger Zellen) größere Mengen von DA freisetzen kann als im lädierten Striatum und daß rechtes und linkes Striatum jeweils vornehmlich die jeweils kontralaterale Körperhälfte steuern. Dieses experimentelle Prinzip ist aus der Forschung an der einseitig 6-OHDA-lädierten Ratte übernommen worden, wo es intensiv eingesetzt worden ist und zu vergleichbaren Resultaten geführt hat [371]; dies weist darauf hin, daß bestimmte Prinzipien hinsichtlich der Funktion des nigrostriatalen Systems von modellübergreifender Bedeutung sind. Jedoch ist ein entscheidender Vorteil des Neurotoxins MPTP gegenüber 6-OHDA, daß es systemisch verabreicht werden kann, wogegen zur 6-OHDA-Applikation stereotaktische Infusionen erforderlich sind. Diese können im kleineren Maushirn weniger ortsspezifisch als bei Ratten vorgenommen werden, so daß eine derart durchgeführte unilaterale Läsion im MPTP-Mausmodell nur dann angebracht erscheint, wenn sehr spezifische Hypothesen bezüglich Hemisphären-abhängiger Effekte von MPTP zu untersuchen sind.

Klettertests

Apomorphin-(APO)-induziertes Kletterverhalten wird als Indikator für die postsynaptische Sensitivität von DA-Neuronen eingesetzt, da APO die Kletterhäufigkeit durch Netto-Stimulation postsynaptischer D_2-Rezeptoren erhöhen kann. Bei Anwendung dieses Tests auf MPTP-lädierte Mäuse fanden Sundström, Fredriksson und Archer [407] keine Unterschiede in der Kletteraktivität gegenüber kontrollbehandelten Mäusen, wogegen Fung und Lau [252] und Spooren et al. [401] stärkeres Klettern in der MPTP-Gruppe beschrieben. Hinzu kommt, daß bei Gabe einer sehr kleinen APO-Dosis keine Reduktion des Kletterns in der MPTP-Gruppe zu beobachten war, wie sie in der Kontrollgruppe auftrat (was bei letzterer möglicherweise auf eine Stimulation von präsynaptischen D_2-Autorezeptoren zurückzuführen ist) [401]. Zusammengenommen wurde dieses Ergebnismuster im Sinne eines Verlustes von präsynaptischen Rezeptoren und einer Erhöhung der Anzahl postsynaptischer Rezeptoren erklärt. Diese

Interpretation der Verhaltensergebnisse wird durch mehrere Rezeptorbindungsstudien gestützt [252,323,456].

Sensorische Defizite

Im 6-OHDA-Modell der Ratte stellen sensorische Defizite einen häufig untersuchten Symptomkomplex dar, und ein enger Zusammenhang zum Ausmaß des striatalen Dopamin-Defizits konnte nachgewiesen werden [371]. Im MPTP-Mausmodell sind solche Ausfälle weitaus weniger intensiv beforscht worden. Dabei stellt sich das prinzipielle Problem, daß eine eindeutige Trennung von Sensorik und Motorik kaum möglich ist, denn verminderte sensorische Leistungen werden typischerweise aus einer verringerten *motorischen* Reaktion auf eine Stimulation geschlossen; andererseits haben zweifelsohne auch die bisher vorgestellten Verfahren (z.B. Pole-Test, Rorarod, Greif-Tests) eine sensorische Komponente. Aus dieser Sicht beschreibt der Begriff "sensomotorisches Defizit" den beobachtbaren Sachverhalt vielleicht zutreffender.

In einer Reihe von Arbeiten untersuchte die Gruppe um Weihmuller somatosensorische Orientierung, indem Kopf und Hinterflanken mittels Von-Frey-Haaren - das sind dünne Drähte, die eine taktile Stimulation mit einer definierten Kraft erlauben - gereizt wurden. Dabei wurden in MPTP-behandelten Mäusen Defizite in der Reaktivität auf solcherlei Reizung festgestellt, aber nur dann, wenn vor der Testung zusätzlich Haloperidol verabreicht wurde [449,451]. Diese Defizite wurden auch in moderat lädierten Tieren (striataler DA-Verlust unter 70%) gefunden, und innerhalb von fünf Monaten fand eine Spontanerholung statt, die parallel zur Erholung der DA-Konzentration im Striatum verlief [450]. Die Testprozedur war zudem geeignet, ein Verschwinden der Defizite bei anhaltender Gabe von GM_1-Gangliosid nachzuweisen [452,453]. Eine andere Arbeit untersuchte das Verhalten moderat MPTP-lädierter Mäuse hinsichtlich Schmerzreizen ("tail flick test", "hot plate test", Formalintest) [349]; einige Ergebnisse deuteten auf erhöhte Schmerzwahrnehmung hin, was von diesen Autoren mit einer möglichen Rolle von DA bei der tonischen Hemmung der Schmerzwahrnehmung interpretiert wird.

Lernen und Gedächtnis

Abgesehen von den im Vordergrund stehenden sensomotorischen Einschränkungen sind auch kognitive Defizite bei PD-Patienten bekannt [421]. Daher ist es von Interesse, ob Derartiges auch nach einem Neurotoxin-induzierten Dopaminverlust in der Maus zu verzeichnen ist. In einer Aufgabe, die die passive Vermeidung eines aversiven Reizes erfordert, fand sich bei de-

ren Wiederholung in MPTP-behandelten Tieren ein Trend zu einer beeinträchtigen Retentionsleistung [161]. Die Ergebnisse aus zwei Studien, die eine aktive Vermeidungsaufgabe einsetzten [442,443], sind hingegen nicht eindeutig interpretierbar, da dem Design angemessene Kontrollgruppen fehlen und erhöhte Antwortlatenzen möglicherweise mit dem motorischen Defizit einer Akinesie konfundiert sind. In einer komplexen T-Labyrinth-Aufgabe zeigten Mäuse eingeschränkte Fähigkeit, die Endarme alternierend aufzusuchen, jedoch nur in einer Bedingung, in der die Länge der Pausen zwischen den einzelnen Versuchsdurchgängen stark variiert wurde [418]. Wenn Mäusen abverlangt wurde, aus einem Wasser-T-Labyrinth zu entfliehen, ergab sich ein (nicht-signifikanter) Trend im Sinne von langsamerem Lernen und langsamerer Extinktion in der MPTP-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe [408]. Der Bearbeitung derartiger Aufgaben schreibt man eine Beteiligung des Frontalkortex zu, und die gefundenen Defizite sind möglicherweise zum Teil auf eine Schädigung der mesokortikalen Bahn, die einen wichtigen DAergen Eingang des Frontalkortex darstellt [254], zurückzuführen. Als ein weiterer Ansatz wurde ein sozialer Gedächtnistest eingesetzt, in dem MPTP-behandelte Mäuse sowohl eingeschränkte Habituation auf einen sozialen Stimulus (eine Maus) als auch verminderte Dishabituation nach Veränderung dieses Stimulus aufwiesen [102]; diese Defizite wurden jedoch nicht auf Dopaminverlust (der bei der verwendeten geringen MPTP-Dosierung nahezu nicht auftrat), sondern auf NA-Verlust im Bulbus olfactorius zurückgeführt.

Krampfanfälle

Es gibt einige Beobachtungen, daß MPTP Krampfanfälle [263,473] oder zumindest klonische Bewegungsmuster [42,294,353,473] hervorrufen kann. Bonucelli et al. haben diese konvulsive Wirkung von MPTP mittels einer Rating-Skala eingeschätzt, die Verhaltens- und Kortexableitungsdaten integriert, und fanden dabei eine dosisabhängige Induktion von Krampfaktivität bereits Minuten nach MPTP-Gabe [42,43]. Dieser Effekt war abgemildert bei pharmakologischer Inhibition von MAO-B, also demjenigen Enzym, das MPTP zu MPP^+ umwandelt. Andererseits unterschieden sich MPTP- und kontrollbehandelte Mäuse 7 Tage nach Behandlung nicht in der Dosis an Pentylentretrazol (einer stark krampfschwellensenkenden Substanz), die nötig war, um Anfälle auszulösen [161]. Es kann daher vermutet werden, daß der epileptogene Effekt von MPTP ein akuter ist. Jedoch kann sich dieses Phänomen natürlich auf andere zu messende Verhaltensweisen auswirken, und außerdem liegt hierin möglicherweise eine Ursache für MPTP-bedingte Mortalität [42,263].

Stereotypien

Einige Experimentatoren haben berichtet, daß MPTP-Behandlung zu einem akuten Anstieg an stereotypem Verhalten führen kann, sichtbar z.B. bei Verhaltensweisen wie Kauen oder Putzen [42,263]. Da stereotypes Verhalten mit striataler DA-Aktivität im Striatum in Zusammenhang gebracht wird, ist eine mögliche Erklärung für dessen Auftreten die durch MPTP akut bewirkte striatale DA-Freisetzung [168]. Im Gegensatz zu diesem akuten Effekt waren in einer anderen Studie spontanes Putzen und Kratzen im Offenfeld sieben Tage nach MPTP vermindert [65]. Die zusätzliche Verabreichung von Dopaminomimetika führte zu verschiedenen Ergebnissen: In MPTP-behandelten Tieren traten Stereotypien auf (L-DOPA [313]), oder sie waren stärker als vor der pharmakologischen Stimulation (APO [470]), kein Unterschied zwischen MPTP und kontrollbehandelten Tieren wurde gefunden (APO [407]), oder es traten widersprüchliche Ergebnisse - abhängig von Dosierung und Stamm - nach AMPH-Gabe auf [365]. Obwohl die Gesamtheit dieser Ergebnisse nicht eindeutig ist, scheint doch eine Erhöhung der Anzahl von DA-Rezeptoren, wie sie infolge einer MPTP-Behandlung auftreten kann [365], ein plausibler Mechanismus zu sein, um die ausgeprägtere Reaktion auf DA-Rezeptoragonisten erklären zu können.

1.4.5 Stammunterschiede im MPTP-Mausmodell

Bereits in den achtziger Jahren wurde eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht, in denen die Stammabhängigkeit des Ausmaßes der MPTP-Wirkung untersucht wurde. In Tabelle 2 sind derartige Studien synoptisch dargestellt; aus dieser Übersicht ist erkennbar, daß z.T. deutliche Unterschiede zwischen Mausstämmen hinsichtlich des Grades der Schädigung, die durch eine bestimmte MPTP-Dosis verursacht werden kann, gefunden worden sind. Hervorzuheben ist die Tatsache, daß sich in nahezu allen Vergleichen der Stamm C57BL als besonders suszeptibel für MPTP erwiesen hat. Erstaunlicherweise sind jedoch nur wenige Autoren angesichts dieser Stammunterschiede näher auf die bedeutsame Implikation eingegangen, daß diese einen deutlichen Hinweis auf genetische Einflußvariablen auf die MPTP-Suszeptibilität[2] darstellen [200]. Häufig waren bei pigmentierten Stämmen stärkere MPTP-bedingte Schädigungen zu beobachten als bei unpigmentierten Stämmen, sogenannten Albinostämmen.

[2] Die Begriffe MPTP-Suszeptibilität, MPTP-Sensitivität und MPTP-Anfälligkeit werden in der vorliegenden Arbeit synonym verwendet und beschreiben die Eigenschaft der Empfänglichkeit eines Organismus für MPTP, gemessen am Ausmaß neurotoxischer Auswirkungen einer MPTP-Behandlung.

Tabelle 2. Stammvergleiche im MPTP-Mausmodell

Referenz	Ergebnisse
[26]	für gleiche striatale DA-Depletion war in einem pigmentiertem Stamm höhere MPTP-Dosis erforderlich als in einem Albinostamm
[29]	striatale DA-Depletion höher bei C57BL (pig) als bei CF1 (alb)
[46]	für gleiche striatale DA-Depletion war bei C57BL/6 (pig) höhere MPTP-Dosis erforderlich als bei BKW (alb)
[100]	striatale DA-Depletion bei C57BL/6 (pig) 70% und bei CD-1 (alb) 40%
[103]	striatale DA-Depletion signifikant nur bei C57BL/6 (pig), nicht bei CD-1 (alb)
[146,147]	nur bei CD-1 (alb), nicht bei C57BL/6N (pig) anfängliche Hyperthermie und Induktion von HSP-72; DA-Depletion bei CD-1 (alb) geringer
[166]	striatale DA-Depletion 95% mit hohem Zellverlust bei C57BL/6 (pig), bei FVB/N führte eine sogar noch höhere MPTP-Dosis zu geringerer Depletion ohne signifikanten Zellverlust
[167]	striatale DA-Depletion: C57BL (pig) > SW > CD-1 (alb), CF-1 (alb); SW von verschiedenen Lieferanten unterschieden sich
[184]	Zellverlust in der SN: C57BL/6J (pig) > DBA/1J (pig) > C3H/HeJ (pig) > DBA/2J (pig), C57L/J > AKR/J (alb); SW (alb)
[187]	striatale DA-Depletion rangierte zwischen 10% und 73% bei SW (alb) von verschiedenen Lieferanten
[189]	deskriptive Erwähnung von Stamm- und Verhaltensunterschieden: C57BL-Mäuse (pig) hatten nach MPTP Haltungsauffälligkeiten und reduzierte Lokomotion, SW (alb) erschienen dagegen relativ normal
[200]	Stärke der Depletionseffekte über verschiedene Transmitter und Hirnregionen hinweg: C57BL/6 (pig) > Mott (pig) > hph-1/Pas (pig) > C57BL10ScSn (pig) > C57BL10ScSn-cc (alb) > BEW (alb) > MF1/aa (alb) > BALB/c/Lac (alb)
[216]	DA-Wiederaufnahme bei C57BL (pig) stärker reduziert als bei NMRI (alb)
[270]	C57BL/6 (pig) vs. NMRI (alb); im peripheren NS keine Stammunterschiede für Verlust von NA in Iris und Herzaurikel und NA und DA im superioren zervikalen Ganglion
[271]	^{3}H-MPTP wurde in verschiedenen Geweben bei C57BL (pig) und NMRI (alb) gleich stark aufgenommen; Ausnahme: stärkere Aufnahme in pigmentiertes Gewebe bei C57BL (z.B. Auge)
[307]	striatale DA-Depletion und Zellverlust in SN war höher bei C57BL (pig) als bei CD-1 (alb)
[332]	bei einer hohen MPTP-Dosis stärkere motorische Reduktion in OF-1 (alb) als in C57BL/6 (pig) ; effektivere Protektion vor MPTP-Neurotoxizität durch Deprenyl bei C57BL/6
[342,343]	striatale DA-Depletion bei C57BL (pig) höher als bei CF1 (alb)
[396]	striatale DA-Reduktion am stärksten bei C57BL (pig), geringer bei CF-W (alb), noch geringer bei BALB/C (alb), n.s. bei CF-1 (alb) und CD-1 (alb); Swiss-Webster (=CF-W) von verschiedenen Lieferanten unterschieden sich in Mortalität und striataler DA-Depletion
[397]	striatale DA-Depletion in C57BL (pig) höher als in CD-1 (alb)
[398]	keine Unterschiede der striatalen DA-Depletion zwischen C57 (pig) und Swiss-Webster
[409]	DA-Depletion im NAcc und Striatum etwas höher bei C57/BL/6 (pig) als bei NMRI (alb)
[410]	striatale DA-Depletion am höchsten bei C57BL/6 (pig), etwas geringer bei NMRI (alb) und CBA/Ca, am geringsten bei Swiss-Webster
[415]	Verlust von Purkinje-Zellen in Cerebellum und SNpc Zellen in C57BL (pig) höher als in CD-1 (alb)

pig = pigmentiert; alb = albino.

Festing weist jedoch zu Recht darauf hin, daß zwischen Mausstämmen natürlich wesentlich mehr genetische Unterschiede bestehen als nur für die leicht beobachtbare Pigmentierung [124], und nimmt an, daß mehrere Gene an der Steuerung des Phänotyps der MPTP-Suszeptibilität beteiligt sind. Nach diesen Überlegungen könnte die Koinzidenz von Pigmentierung und hoher MPTP-Anfälligkeit rein zufällig sein; andererseits war beim Vergleich zweier für Pigmentierung kongener Stämme, d.h. Stämmen, die so gezüchtet wurden, daß sie sich genetisch nur im Pigmentierungsgen und dessen flankierendem Bereich unterscheiden [200], wiederum der pigmentierte stärker betroffen. Pigmentierung ist das Vorhandensein des Pigmentfarbstoffs Melanin; dies könnte demnach möglicherweise relevant für MPTP-Neurotoxizität sein. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, daß sich MPTP bei systemischer Gabe in melaninhaltigem Gewebe anreichert [271] und daß sich MPP^+ mit starker Affinität an Neuromelanin anlagert, den in Neuronen der SN vorkommenden Pigmentfarbstoff [90]. Allerdings sind - wenn überhaupt - nur sehr geringe Mengen von Neuromelanin im Gehirn von Nagern vorhanden [90,271,425].

Auch innerhalb anderer Spezies als der Maus wurde unterschiedliche Anfälligkeit für MPTP beobachtet. Dies ist z.B. durch den Vergleich mehrerer Rattenstämme belegt [341]. Interessanterweise wurden auch bei Schweinen und Affen starke interindividuelle Unterschiede beobachtet im Sinne unterschiedlicher Erholungsverläufe oder der Tatsache, daß für gleich hohe Läsionseffekte einzelne Tiere mit unterschiedlich hohe MPTP-Dosen behandelt werden mußten [162,193,287,290]; dies ist jedoch von den Autoren in erster Linie als methodisches Problem, nicht so sehr als mögliche Evidenz für genetische Einflüsse gesehen worden.

Des weiteren ist auch das Phänomen *inter*spezifischer Unterschiede diskutiert worden: Ratten z.B. erwiesen sich im Vergleich zu Mäusen deutlich resistenter gegenüber MPTP; auf die Unterschiede zwischen verschiedenen Arten soll in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher eingegangen werden (für weiterführende Informationen zu dieser Thematik siehe [131,168,169,402,409]).

1.4.6 Mögliche Determinanten von Suszeptibilitätsunterschieden

Die Befunde zu Stammesunterschieden werfen die Frage auf, welche Mechanismen die Unterschiede in der Anfälligkeit zwischen Stämmen und sogar Spezies bedingen könnten. In der folgenden Auflistung werden zum einen Faktoren referiert, die in Stammvergleichsstudien untersucht wurden; zum anderen werden Mechanismen aufgeführt, die aufgrund von Befunden

mit anderen methodischen Ansätzen (vor allem transgene und Knockout-(KO)-Studien[3]) als relevant für den neurotoxischen Prozeß angesehen werden. Die tatsächliche Beteiligung dieser Mechanismen an den beobachteten Stammunterschieden ist in den meisten Fällen spekulativ. Ihre Nennung soll in erster Linie illustrieren, auf wie vielfältigen Wegen interindividuelle Unterschiede vermittelt sein *könnten*.

Pharmakokinetik von MPTP

a) MPP^+-Produktion

Ein entscheidender Schritt für die Neurotoxizität von MPTP ist dessen Umwandlung zu MPP^+ durch MAO-B; wird dies pharmakologisch durch MAO-B-Hemmer unterbunden, bleiben Schäden im nigrostriatalen System aus [190,191,273], gleiches gilt bei einem KO von MAO-B [177]. Im Stammvergleich haben C57BL-Mäuse eine höhere zentrale MAO-B Aktivität als NMRI-Mäuse, was mit der MPTP-Sensitivität der Stämme korrespondiert [472]. Andere, z.T. umfangreichere Studien, in denen weitere Stämme verglichen wurden, fanden allerdings keine signifikante Korrelation zwischen striataler MAO-B-Aktivität und Sensitivität für MPTP [167,216,404], und eine transgen gesteigerte neuronale MAO-B-Aktivität erhöht die MPTP-Sensitivität nicht weiter [10]. Ein anderer Ansatz geht von der Überlegung aus, daß die Umwandlung von MPTP zu MPP^+ *außerhalb* des Gehirns die Neurotoxizität senken müßte, da MPP^+ die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann. Tatsächlich ergaben sich bei Stammvergleichsstudien an Mäusen und Ratten dementsprechende Korrelationen zwischen der MAO-B-Aktivität an der Blut-Hirn-Schranke und der beobachteten MPTP-Neurotoxizität [341,342], jedoch sind auch Negativbefunde bekannt [216,404]. Auch wenn die referierten Befunde nicht eindeutig hinsichtlich der spezifischen Rolle von MAO-B sind, ist immerhin zu vermuten, daß die MPTP-Suszeptibilität durch pharmakokinetische Effekte mitbestimmt wird, was sich z.B. an der bei Stammvergleichen gefundenen Korrelation zwischen der striatalen MPP^+-Konzentration und dem Ausmaß der DA-Depletion ablesen läßt [167].

b) Transport

Einen drastischen Einfluß auf die MPTP-Neurotoxizität hat die Funktion von Dopamintransportern. Wie schon in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, gelangt MPP^+ über den Dopamin-

[3] Ein "Knockout" (KO) für ein Gen bezeichnet den Sachverhalt, daß in einem Tier dieses Gen so manipuliert wurde, daß dessen Genprodukt nicht gebildet wird. Beim transgenen Tieren wird dagegen das Genom in dem Sinne manipuliert, daß ein neues Gen eingeschleust oder die Kopienzahl eines vorhandenen Gens verändert wird [86,328].

transporter (DAT) in dopaminerge Neuronen. Ein Knockout des DAT (DAT-/-) macht Mäuse vollkommen resistent gegen striatalen DA- und nigralen Zellverlust durch systemische Behandlung mit MPTP, während bei Heterozygoten (DAT+/-) Neurotoxizität zwar auftritt, aber in geringerem Maße als beim Wildtyp (DAT+/+) [36,156]; Überexpression von DAT erhöht die Suszeptibilität [106]. Regionale Unterschiede in der MPTP-Anfälligkeit dopaminerger Neuronen korrelieren zudem mit Konzentrationen von DAT bzw. dessen mRNA[277,357]. Auf der anderen Seite transportiert der vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) MPP^+ vom Zytosol in synaptische Vesikel; dieser Prozeß scheint eine Entgiftungsfunktion auszuüben (in dem Sinne, daß dieses "abgekapselte" MPP^+ nicht neurotoxisch wirken kann). Dementsprechend ist die Neurotoxizität in Tieren, die heterozygot für einen KO des VMAT sind (VMAT+/-), ausgeprägter als im Wildtyp (VMAT+/+) [157,416]. In vitro ist es gelungen, ursprünglich anfällige Zellen durch Transfektion dieses Transportmechanismus resistent gegen das Neurotoxin zu machen [266]. Interessanterweise weist die Mausmutante *tottering*, die sich u.a. durch erhöhte Anzahl von VMAT2-Bindungsstellen auszeichnet, auch eine reduzierte Anfälligkeit für MPTP auf [225]. Dagegen waren in den zwei unterschiedlich MPTP-sensitiven Mausstämmen C57BL/6 und CD-1 die striatalen Konzentrationen des vesikulären Monoamintransporters gleich [224]. Trotzdem wird intensiv diskutiert, daß genetische Unterschiede hinsichtlich der Dopamintransporter zu Unterschieden in der MPTP-Neurotoxizität führen können [293,433]. Ein hochinteressanter Befund, der eine derartige Annahme stützt, stammt von Mitushata et al., die bei der Untersuchung des DAT in der Ratte eine erhöhte Affinität des DAT zu MPP^+ infolge einer bestimmten Punktmutation fanden (die zum Austausch nur einer Aminosäure führt), während eine andere Mutation zwar die Geschwindigkeit der MPP^+-Aufnahme erhöhte, gleichzeitig aber die Affinität für MPP^+ senkte [295].

Physiologische Pufferfunktionen

Da erhöhte intraneuronale Kalziumkonzentrationen nach MPTP-Behandlung zur Zellschädigung beitragen können und beispielsweise die pharmakologische Blockade von Ca^{++}-Kanälen MPTP-bedingten striatalen DA-Verlust verringert [240], ist wiederholt untersucht worden, welche Rolle die physiologische Pufferung des Kalziumspiegels spielt. MPTP-Gabe zieht eine Erhöhung des Kalzium-bindenden Proteins Calbindin nach sich, was als Schutzmaßnahme gegen erhöhte intrazelluläre Ca^{++}-Konzentrationen gewertet wird [310], und diejenigen dopaminergen Neuronen im Mittelhirn, die Calbindin-haltig sind, scheinen nach Ergebnissen zweier Studien weniger MPTP-anfällig zu sein [261,358]. Andererseits waren Calbindin-KO-Mäuse nicht MPTP-anfälliger als der Wildtyp [4], und ein Stammvergleich ergab keine Un-

terschiede in der relativen Dichte von Calbindin-positiven Neuronen in der SN zwischen C57BL/6 und dem MPTP-resistenteren Stamm CD-1 [307], Ergebnisse, die eher gegen eine signifikante Beteiligung von Calbindin oder anderen Ca^{++}-Puffern (Calretinin, [4]) bei der Ausgestaltung von individuellen Suszeptibilitäten sprechen.

Ausgangszellzahlen

Einen anderen Faktor, der schon früh in Betracht gezogen wurde, die Anfälligkeit des nigrostriatalen Systems für Neurodegeneration zu beeinflussen, stellt die Ausgangsanzahl von SN-Neuronen dar, ein Parameter, der genetisch kontrolliert ist [22]. Nach diesen Überlegungen wird vermutet, daß eine geringere Ausgangszellzahl möglicherweise prognostisch ungünstig ist, da eine kritische Grenze der Anzahl von Zellen, die für die Aufrechterhaltung nigrostriataler Funktionen mindestens nötig ist, schneller unterschritten werden könnte [307,350]. Muthane et al. fanden im Stamm C57BL/6 höhere prozentuale Zellverluste nach MPTP bei geringeren Ausgangszellzahlen als im CD-1-Stamm [307]. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß diese Konstellation auch rein zufällig bestehen könnte. Um die Aussage eingehender zu prüfen, müßten beide Parameter in mehreren Stämmen erhoben werden, um eine genetische Korrelation berechnen zu können (zu diesem methodischen Ansatz siehe [30]).

Produktion und Detoxifikation von freien Radikalen

Ein anderer Weg, über den MPTP eine Schädigung dopaminerger Neuronen ausübt, ist die vermehrte Produktion freier Radikale. Da freie Radikale bei vielen physiologischen Vorgängen entstehen, sind Organismen mit leistungsfähigen Radikalfängersystemen ausgestattet [57]. Das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) beispielsweise wandelt Superoxid-Radikale zu minder schädlichem Wasserstoffperoxid um; Überexpression von SOD in transgenen Mäusen verringert die MPTP-Neurotoxizität. Die Substanz DDC ist ein SOD-Inhibitor [226] und wird eingesetzt, um die MPTP-Wirkung zu erhöhen [445]; die MPTP-verstärkende Wirkung von DDC hängt deshalb vermutlich mit einer resultierenden verringerten Entgiftung von freien Radikalen zusammen [57,445]. Katalase und Glutathion-Peroxidase wiederum wandeln Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff um; Mäuse mit einem Knockout für letzteres Enzym sind MPTP-anfälliger [230]. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, daß die Basisaktivität von Katalase und Glutathion-Peroxidase im weniger MPTP-anfälligen dopaminergen mesolimbischen System höher ist als im sehr anfälligen nigrostriatalen System [204]. Andererseits besitzt der Organismus eigens Enzyme zur Produktion von freien Radikalen wie dem Stickoxid (NO), das als Botenstoff fungieren kann und durch Stickoxid-Synthase (NOS)

hergestellt wird. Stickoxid bildet zusammen mit Superoxid das extrem aggressive Peroxynitrit. Mehrere Arbeiten belegen, daß die Abwesenheit von NO die durch MPTP verursachte neurotoxische Schädigung verringert: Pharmakologische Hemmung von NOS verringert die striatale DA-Depletion und die Konzentration freier Radikale [229,367,389]; die Läsionsstärke ist auch reduziert in KO-Mäusen für neuronale NOS, während die NO-Produktion durch zwei andere NOS-Formen, endotheliale und induzierbare NOS, vermutlich einen weitaus geringen Anteil an der MPTP-Toxizität hat [208,262,282]. Diese Auflistung verdeutlicht, daß sich im Metabolismus freier Radikale viele Prozesse in ihrer jeweiligen Ausprägung zwischen Individuen unterscheiden und so zu differentieller Suszeptibilität beitragen könnten.

Wachstumsfaktoren

Nicht nur interindividuelle Unterschiede in Abwehr-, sondern auch in Reparaturmechanismen können das Ergebnis einer Läsion mitbestimmen. Der im Gehirn vorkommende neurotrophe Faktor BDNF liegt beispielsweise in höherer Konzentration im mesolimbischen als im stärker suszeptiblen nigrostriatalen System vor, und experimentelle BDNF-Infusion in die SN bietet partiellen Schutz gegen MPTP [203]. Ferner wurde gezeigt, daß die Expression des Wachstumsfaktors FGF-2 durch MPTP angeregt wird und in zeitlicher Übereinstimmung mit neuronaler Regeneration steht [258]. Übertragen auf potentiell vorhandene Unterschiede zwischen Individuen in der Produktion von Wachstumsfaktoren würde dies eine unterschiedlich starke Fähigkeit zu neuronaler Regeneration mitbedingen.

Exzitotoxizität-beeinflussende Faktoren

In mehreren Arbeiten wurde beobachtet, daß NMDA-Antagonisten die MPTP-Neurotoxizität abmildern können [41,50,64,219,413], obwohl es dazu auch negative Befunde gibt [63]. Auch indirekt konnte die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität nach einer MPTP-Behandlung verringert werden, indem hemmende α_2-Adrenorezeptoren auf glutamatergen Axonen pharmakologisch angesprochen wurden [130]. Die Protektion war in der Regel nicht vollständig, sondern partiell. Denkbar ist, daß genetische Unterschiede die exzitotoxische Kaskade beeinflussen könnten.

Apoptoseregulatoren

Apoptose ist ein Mechanismus, der zu kontrolliertem Zelltod führt; er kann durch die Anwesenheit freier Radikale ausgelöst werden [316] und ist nach MPTP-Behandlung neben Nekrose einer der finalen Schritte, die zum Zelltod führen [337]. Apoptose wird durch das Zusam-

menspiel mehrerer regulatorischer Proteine gesteuert. Das Protein p53 spielt eine wichtige Rolle bei der Einleitung von Apoptose; Mäuse mit einem Knockout des p53-Gens zeigen Resistenz gegen striatale Neurodegeneration durch MPTP [429]. Bcl-2 ist ein Apoptose unterdrückender Faktor, dessen Anwesenheit sowohl antioxidativ wirkt als auch mitochondriale Funktionen verbessert. Mäuse, die humanes Bcl-2 überexprimierten, erwiesen sich, gemessen am striatalen DA-Verlust, gegenüber dem Wildtyp als sehr MPTP-resistent, und in vitro kam es auch zu geringeren MPTP-induzierten Zellverlusten in Bcl-2-überexprimierenden Zellkulturen [316,465]. Ein Bcl-2-Knockout führt dagegen dazu, daß diese Mäuse höhere DA-Depletion und massive Letalität durch MPTP zeigen [197]. Die Expression des Faktors bax, der Bcl-2 inaktivieren kann, steigt bei MPTP-Behandlung an [185]. Diese Befunde legen nahe, daß genetisch bedingte Unterschiede in diesem komplexen Zusammenspiel von Apoptoseregulatoren MPTP-bedingte Neurodegeneration beeinflussen könnten.

Immunantwort

Vereinzelt gibt es Befunde, wonach Immunreaktionen in neurodegenerativen Erkrankungen die neuronale Schädigung beeinflussen können [239,241]. Einerseits kann die Immunantwort durch Immunsuppressiva verringert werden, was mit einer Abnahme der neuronalen Schädigung einhergeht [228,241], andererseits scheinen manche Komponenten der Immunantwort (z.B. die Induktion von Interleukin-1α) auch an einer Regeneration von dopaminergen Neuronen beteiligt zu sein [196]. Es wäre demnach möglich, daß die (wie auch immer bedingte) Immunkonstitution eines Organismus einen Anteil an der individuellen Ausprägung der Neurodegeneration hat; der Beitrag zur Gesamtsuszeptibilität dürfte aber eher gering sein.

1.4.7 Geschlechtsunterschiede

Mehrere Studien haben sich mit der Frage befaßt, ob es Geschlechtsunterschiede in den Auswirkungen von MPTP auf das nigrostriatale System gibt; diese Frage ist unter anderem deswegen interessant, weil einerseits Einflüsse des Geschlechtshormons Östrogen auf Basalganglienerkrankungen beim Menschen beobachtet worden sind (Übersicht bei [437]) und andererseits in vitro gezeigt wurde, daß Östrogen die striatale DA-Freisetzung modulieren kann [28]. Auch die Tatsache, daß mehr Männer als Frauen an PD erkranken, wird hinsichtlich Östrogenwirkungen auf nigrostriatale Degeneration diskutiert (Referenzen siehe [174,291]). Unzeta et al. fanden, daß C57BL/6 Männchen und Weibchen 24 Stunden nach MPTP zunächst vergleichbare striatale DA-Verluste aufwiesen; zehn Tage nach Behandlung jedoch waren die DA-Konzentrationen bei den Männchen partiell erholt, wogegen sich die Depletion bei Weib-

chen sogar noch weiter erhöht hatte [434]. Die Autoren stellten in Kontrolltieren zyklusabhängige Schwankungen der zerebralen MAO-B-Aktivität fest, die zeitweise zu höheren Aktivitäten bei Weibchen gegenüber Männchen führten; sie vermuteten - unter Berücksichtigung des Befundes, daß die Wiederaufnahme von Dopamin zyklusabhängig ist [94], daß dies eine Quelle für die geschlechtsspezifischen Unterschiede der MPTP-Wirkung darstellt. Auch Duvoisin et al. beobachteten eine ausgeprägtere MPTP-Neurotoxizität bei Weibchen [111].
Im Gegensatz dazu beobachteten Freyaldenhoven, Cadet und Ali [148] in CD-1-Mäusen, daß Männchen einen Tag nach Behandlungsende eine stärkere Depletion aufwiesen als Weibchen, ein Effekt, der auch nach fünf Tagen stabil blieb. Obwohl die Weibchen höhere MPP^+-Werte in der Leber und damit eine offenbar stärkere periphere Entgiftung aufwiesen, unterschieden sich die MPP^+-Konzentrationen im Striatum nicht zwischen beiden Geschlechtern, was gegen eine rein pharmakokinetische Erklärung der differierenden MPTP-Anfälligkeiten spricht. In vitro zeigten Disshon and Dluzen, daß die MPP^+-induzierte striatale Freisetzung von DA in Anwesenheit hoher Dosen von Östrogen geringer ausfiel [98]. In einem anderem Experiment erhielten Versuchsgruppen von ovarektomierten Weibchen und kastrierten Männchen des Stammes C57BL/6 entweder eine zehntägige Vorbehandlung mit Östrogen oder Vehikel. Nach Gabe von MPTP fiel in beiden Geschlechtern die gemessene striatale DA-Depletion in den Östrogen-vorbehandelten Gruppen geringer aus als in den Gruppen, die eine Vehikelbehandlung erhalten hatten [104]; in Weibchen des Stamms CD-1 wurde dieser Effekt - bei insgesamt deutlich geringerer Depletion - dagegen nicht signifikant [103]. Die Ursache der gefundenen neuroprotektiven Effekte von Östrogen ist noch nicht hinreichend geklärt. In einer weiteren Studie der Dluzen-Gruppe wurde eine verringerte Depletion auch nach Östrogenbehandlung in 6-OHDA-lädierten Ratten beobachtet, und es wurde hier vermutet, daß Östrogen Wiederaufnahmeprozesse in nigrostriatale Neuronen moduliert [99]. Dagegen spricht allerdings der schon erwähnte Befund, daß die striatalen MPP^+-Konzentrationen von intakten Männchen und Weibchen sich als gleich erwiesen, während die DA-Depletion bei den Männchen stärker war [291]. Alternativ wird spekuliert, ob die antioxidativen Eigenschaften von Östrogen von Bedeutung sind [71,291]. Allerdings sind wiederum auch selektive Östrogenrezeptormodulatoren ohne starkes antioxidatives Potential in der Lage, die DA-Depletion deutlich zu verringern [174]. Im Gegensatz zu Östrogen gibt es für das Geschlechtshormon Testosteron keine empirischen Anhaltspunkte für Neuroprotektion gegen MPTP [101]. Geschlechtsunterschiede hinsichtlich der MPTP-Auswirkungen auf Verhaltensdefizite sind nach Kenntnisstand des Autors bislang nicht untersucht worden.

1.4.8 Altersunterschiede

Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle erwähnt, aber nicht weiter vertieft werden, daß die Stärke der MPTP-Wirkung auch altersabhängig ist: Aus mehreren Studien geht hervor, daß ältere Mäuse MPTP-anfälliger sind als junge [6,180]. Ein Erklärungsansatz geht von der Beobachtung aus, daß die MAO-B-Aktivität mit dem Alter ebenfalls ansteige und deshalb mehr MPP^+ produziert wird [162]. Diese pharmakokinetische Erklärung wird allerdings kontrovers diskutiert [206,344].

1.5 Quantitative Trait Loci-(QTL)-Analysen

1.5.1 Problemstellung

Seit Jahrzehnten gibt es Versuche, genetische Einflüsse auf komplexe Eigenschaften zu analysieren. Solche Eigenschaften sind in der Regel normalverteilte Merkmale, von denen man annimmt, daß ihre individuelle Ausprägung durch das Zusammenspiel mehrerer Gene (= polygen) zustande kommt [47]. Reverse Genetik ist derjenige genetische Forschungsansatz mit dem Ziel, von einem Merkmal (Phänotyp) ausgehend, chromosomale Regionen (= Genorte oder Loci) zu lokalisieren, die mit der Ausbildung dieses Merkmals in Verbindung stehen, und schließlich den biochemischen Prozeß zu identifizieren [255]. Diese Genorte für solche polygen vermittelten, quantitativen Eigenschaften werden in der Fachliteratur allgemein als Quantitative Trait Loci (QTLs) bezeichnet [47]; die kleinstmögliche Region und somit Fernziel einer Experimentalstrategie zum Finden von QTLs sind letztendlich die Gene selbst. Bei der Untersuchung derartiger Fragestellungen bieten Tiermodelle einen entscheidenden Vorteil: In ihnen lassen sich – anders als bei Humanstudien, in denen nur gegebene Stammbäume untersucht werden können – durch experimentelle Manipulation (v.a. Züchtung) kontrolliert Bedingungen herstellen, die für genetische Analysen besonders vorteilhaft sind. Als Versuchstier ist die Maus unter anderem hervorragend geeignet, weil neben umfangreichen Daten über verschiedenste Phänotypen auch außerordentlich detaillierte Information über ihr Genom vorhanden ist. Erste Evidenz für die Beteiligung genetischer Einflußfaktoren stammt oft aus dem phänotypischen Vergleich von Inzuchtstämmen (genetisch homogene Stämme, siehe unten), aus der Untersuchung von Tieren mit Spontan- oder induzierten Mutationen oder aus selektiven Züchtungsexperimenten, bei denen im Tierexperiment Linien für bestimmte Eigen-

schaften erzeugt werden. Unterschiede zwischen derartigen Gruppen lassen auf genetische Beteilung am interessierenden Merkmal schließen.

1.5.2 Experimentelle Ansätze

Ein recht grober Ansatz, um QTLs zu lokalisieren, ist die Durchführung einfacher Kopplungsanalysen, in denen der interessierende Phänotyp (z.B. lokomotorische Aktivität) mit dem Auftreten phänotypischer Marker mit bereits bekannter chromosomaler Lokalisation (beispielsweise Fellfärbungen oder offen sichtbare Mutationen) in Verbindung gesetzt wurde. Da die Zahl phänotypischer Marker sehr begrenzt ist, kann mit Hilfe dieser Methode meist nur die Aussage getroffen werden, daß bestimmte Chromosomen an einer Merkmalsausprägung wie z.B. Offenfeldaktivität [74] mitbeteiligt sind. Ein seit Ende der achtziger Jahre eingesetztes Verfahren zum Auffinden von QTLs, mit der durch Einsatz einer sehr großen Zahl von Markern weitaus genauere Eingrenzungen möglich sind, ist die QTL-Analyse (synonym QTL-Mapping) [47,92]. Dieses Verfahren stellt prinzipiell eine komplexe Kopplungsanalyse dar. Maßgeblich für deren Entwicklung waren die Entdeckung genomischer Marker [245], also in der DNS natürlich und reichhaltig vorkommender Sequenzvariationen, die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktions-(PCR)-Technik zur Vervielfältigung von DNS-Abschnitten, die damit verbundene Zunahme von Wissen über die Struktur des Genoms verschiedener Spezies sowie die Entwicklung entsprechender mathematischer Verfahren und Software, mit der sich derart große Datensätze analysieren lassen [244].

QTL-Analysen sind mittlerweile auf eine Vielzahl von in Tiermodellen untersuchten komplexen Eigenschaften angewendet worden. Dazu zählen eher physiologische Eigenschaften wie z.B. Blutdruck [364], ganz besonders auch aber Verhaltensmerkmale wie Emotionalität [127,128], Lernleistungen [58,448] oder sensorische und motorische Entwicklung [256]. Gegenstand großen Forschungsinteresses ist auch die Suche nach Genen gewesen, die die Sensitivität für verschiedene Substanzen wie Methamphetamin [178] oder Ethanol [81,83,158,327] beeinflussen, wobei in diesem Bereich innerhalb einer Dekade nicht zuletzt unter rasanter Weiterentwicklung der Methodik [364] große Fortschritte erzielt wurden, d.h. eine Reihe von chromosomalen Regionen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit eingekreist werden konnten ([82], siehe dort auch die Übersicht über (verhaltens-) neurowissenschaftlich relevante QTL-Studien).

1.5.3 Ablauf einer QTL-Analyse

Wie im folgenden erläutert, ist ein QTL-Projekt gekennzeichnet durch eine Abfolge mehrerer Etappen [39]:

1. Auswahl zweier Inzuchtstämme

In aller Regel werden für QTL-Analysen Inzuchtstämme verwendet; dies sind Stämme, die aufgrund von gezielter Inzucht über mehr als 20 Generationen für nahezu jedes Merkmal homozygot sind, d.h. auf jedem der beiden homologen Chromosomen das gleiche Allel tragen. Alle Tiere innerhalb eines Inzuchtstammes sind damit genetisch praktisch identisch, und dementsprechend sind auch die Phänotypen sehr ähnlich (beobachtete Variationen sind auf Umwelteinflüsse zurückzuführen). Findet man bei Vergleichen eines Phänotyps unter gleichen Umweltbedingungen zwischen verschiedenen Stämmen Unterschiede, so können diese auf Unterschiede in der für das Merkmal relevanten genetischen Ausstattung, den Genotyp, zurückgeführt werden.

Ein erster Schritt ist die Durchsicht bestehender Literatur bezüglich Vergleichen zwischen Inzuchtstämmen, die für eine Reihe von Phänotypen vorliegen (für Verhaltensmaße siehe z.B. Übersicht bei [87]). In die engere Auswahl kommen Stämme, die sich im interessierenden Maß besonders markant unterscheiden. Die beschriebenen Unterschiede müssen sorgfältig repliziert werden, bzw. für den Fall, daß in der Literatur keine Informationen für einen Phänotyp zur Verfügung stehen, müssen eine Meßprozedur etabliert und ein Screening von Inzuchtstämmen selber durchgeführt werden. Frankel und Taylor [134] weisen ausdrücklich darauf hin, daß das Gelingen einer QTL-Analyse entscheidend von einer möglichst präzisen Phänotypbestimmung abhängt. Die Wahl des verwendeten Mausstamms hängt ferner davon ab, wie hoch die Polymorphismusrate (d.h. das Ausmaß der Unterschiedlichkeit der genetischen Marker) zwischen den Stämmen ist und ob die Tiere sich miteinander verpaaren lassen.

2. Produktion und Analyse einer Filial-(F1)-Generation

Für die folgenden Arbeitsschritte müssen die Einrichtungen und das Fachwissen vorhanden sein, um Züchtungen vorzunehmen zu können: Die beiden ausgewählten Inzuchtstämme werden zunächst zu reziproken F1-Generationen verkreuzt, d.h. Mütter von Stamm A werden jeweils mit Vätern von Stamm B verpaart und umgekehrt. (Die F1-Generationen sind wie die Parentalstämme genetisch homogen, da das Genom der einzelnen Individuen ebenfalls identisch ist, aber die Tiere sind für alle Loci heterozygot, auf denen die Parentalstämme unterschiedliche Allele tragen.) Die F1-Tiere werden dann phänotypisiert; dies dient zur Kontrolle

von geschlechtsabhängigen Vererbungsmodi wie genetischer Prägung ("imprinting", Variation der Genexpression je nach Herkunft eines Allels aus väterlichem oder mütterlichem Genom) oder mitochondrialer Vererbung (diese erfolgt nur über das mütterliche Genom), was als phänotypischer Unterschied zwischen den beiden Teilkreuzungen sichtbar würde. Zusätzlich können quantitativ-genetische Berechnungen durchgeführt werden als Entscheidungshilfe, wie groß die zu untersuchende Tierzahl in der F2-Generation sein sollte oder welche F2-Züchtungsstrategie am erfolgversprechendsten ist. Neben der hier vorgestellten Intercross-Strategie, bei der Individuen der F1-Teilkreuzungen wiederum miteinander verpaart werden, gibt es noch die sogenannte Backcross-Strategie, bei der die F1-Tiere auf einen der beiden Parentalstämme zurückgekreuzt werden. Je nach Charakteristik des jeweiligen Phänotyps und Ziel der QTL-Analyse (z.B. Schätzung der Anzahl relevanter QTLs vs. genaueres Eingrenzen eines Locus mit hoher Varianzaufklärung) weisen diese Strategien jeweils spezifische Vor- und Nachteile auf; eine Übersicht dazu geben Frankel und Taylor [134].

3. QTL-Erkennung

Im nächsten Schritt werden eine F2-Intercross-Population erzeugt und deren Individuen ebenfalls einer Phänotypisierung unterzogen. Durch das Phänomen des Crossing-over, einem zufällig erfolgenden Austausch von DNS-Abschnitten zwischen den homologen Chromosomen während der Keimzellbildung, kommt es zu einer Rekombination von Allelen. Die einzelnen Individuen der F2-Generation unterscheiden sich daher in ihrer genetischen Ausstattung voneinander und weisen deshalb auch meist eine große Streubreite des Phänotyps auf. Es wird dann eine Genotypisierung mit Mikrosatellitenmarkern vorgenommen; in diesem Abschnitt eines QTL-Projektes ist also die Expertise von Molekulargenetikern besonders gefragt. Die eigentliche QTL-Erkennung wird danach mit Hilfe spezieller Software vorgenommen, mittels derer für jeden Marker geprüft wird, ob dessen Vorhandensein mit der Merkmalsausprägung signifikant korreliert. Da multiple Testungen vorgenommen werden, wählt man eine sehr hohe Signifikanzgrenze, um das Risiko falsch positiv detektierter QTLs möglichst gering zu halten.

4. QTL-Kartierung ("Mapping")

Nachdem eine Zahl von QTLs entdeckt worden ist, ist das nächste Ziel, eine Lagebestimmung für diese vorzunehmen. Die am häufigsten verwendete Methode ist das Intervall-Mapping; hierbei werden jeweils Paare von Markern miteinander verglichen. Am Ende entsprechender

Berechnungen steht in der Regel die Angabe von 95%-Konfidenzintervallen, innerhalb derer die QTLs liegen sollten.

5. Feinkartierung ("Fine Mapping")

Diese Konfidenzintervalle sind in aller Regel allerdings so groß, daß in diesem chromosomalen Abschnitt noch ca. 1000 Gene liegen können. Die weitere Eingrenzung erfolgt durch kombinierte Anwendung weiterer Strategien, z.B. durch den Vergleich der identifizierten Region mit dem syntenen (d.h. genetisch vergleichbaren) Abschnitt im humanen Genom. Sind dort bereits plausible Kandidatengene lokalisiert worden, kann eine Überprüfung mittels entsprechender Knockout- oder transgener Tiere erfolgen. Können noch keine Kandidatengene ausgemacht werden, bietet sich beispielsweise die Herstellung intervall-spezifischer kongener Stämme an, die sich nur in Teilen des QTLs-Abschnitts unterscheiden (vertiefende Darstellung von Feinkartierungsansätzen: [39,92,304,432]).

Aus der Beschreibung dieser Abfolge von Arbeitsschritten ist offensichtlich, daß für ein solch komplexes Vorhaben die besondere Expertise verschiedener Disziplinen gefordert ist, so daß in der praktischen Durchführung Laborkooperationen dafür prädestiniert sind.

2 Gegenstand und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

2.1 Skizzierung eines QTL-Mapping-Projektes der MPTP-Suszeptibilität

Die Tatsache, daß die Parkinson-Krankheit gewöhnlich erst im späteren Lebensalter zutage tritt und die betroffenen Personen bis dahin den unterschiedlichsten, kaum nachvollziehbaren Umwelteinflüssen ausgesetzt waren, erschwert die Ursachenforschung am Menschen beträchtlich. Geht man außerdem von der häufig diskutierten Annahme aus, daß eine Prädisposition, an PD zu erkranken, polygen vererbt wird, könnte dies plausibel machen, warum Zwillingsstudien selten zu eindeutigen Ergebnissen bezüglich der Erblichkeit der Erkrankung führten.

Eine alternative Möglichkeit, potentielle genetische Einflüsse auf dopaminerge Neurodegeneration zu erforschen, ist die Modellierung dieser Fragestellung im Tierversuch. Dies hat die Vorteile, daß im Labor Umweltbedingungen besser kontrolliert werden können und daß durch Einsatz gezielter Zucht von Tieren auch das Problem wegfällt, auf natürlich vorkommende genetische Variation angewiesen zu sein. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Versuchsdesign beruht auf einer Reihe von Überlegungen:

- Morbus Parkinson tritt bei Tieren nicht spontan auf; durch Gabe geeigneter Neurotoxine kann aber auf neuropathologischer wie auf Verhaltensebene Parkinsonismus hergestellt werden, ein Zustand, der große Parallelen zur humanen Erkrankung aufweist [162].
- Die Applikation des Neurotoxins MPTP in der Maus wird als ein Modell angesehen, das nicht nur oberflächlich einen PD-ähnlichen Zustand herstellt, sondern das auf molekularer Ebene große Gemeinsamkeiten mit der humanen Krankheit besitzt [192,299,336,337].
- Die Maus ist eine Spezies, die sich relativ problemlos züchten läßt und über die bereits umfangreiche genetische Informationen einschließlich Vergleichsinformationen zur Relation von Maus- vs. menschlichem Genom (Syntenie) vorliegen.
- Es ist gut belegt, daß sich Mausstämme in ihrer Anfälligkeit für MPTP unterscheiden, was eine genetische Basis der MPTP-Suszeptibilität, d.h. einer induzierten Neurodegeneration vornehmlich des nigrostriatalen Systems, nahelegt. Diese Unterschiede sind offenbar quantitativer Natur, sie liegen also in vielen Abstufungen vor (vgl. Tabelle 2), was auf eine polygene Vererbung deutet. Ferner gibt es eine große Anzahl von möglichen Mechanismen, über die dies vermittelt sein kann; das Bestätigen oder Verwerfen dieser Möglichkeiten mittels Einzelüberprüfung wäre sehr mühsam. Es ist außerdem zu vermuten, daß weitere Mechanismen überhaupt noch nicht identifiziert worden sind.

- Mit der QTL-Analyse steht ein heuristisches Verfahren zur Verfügung, um phänotypische Variation mit genotypischer Variation in Verbindung zu setzen.

Diese Fakten führten zur Planung eines QTL-Analyse-Projektes, mit dem genetische Mechanismen der MPTP-Suszeptibilität untersucht werden sollen: Dazu müssen Mäuse aus einer Parental-, einer F1- und einer F2-Generation mit MPTP behandelt werden und dessen neurotoxische Wirkungen quantifiziert werden. Das individuelle Ausmaß dieser neurotoxischen Wirkungen wird in der F2-Generation mit genetischer Variation korreliert, um merkmalsrelevante Abschnitte auf dem Genom auszumachen. Ein solches Vorgehen, bei dem im Sinne des Suszeptibilitätskonzeptes ein Phänotyp durch Behandlung mit einer Substanz hergestellt wird, hat kürzlich bereits in der tierexperimentellen Epilepsieforschung zur Identifikation Epilepsie-relevanter QTLs geführt. Hier wurde die individualspezifische Wirkung der Stoffe Kainat bzw. Pentylentetrazol, bei F2-Mäusen einen Krampfanfall auszulösen, getestet [122,444]. Auch Loci, die das Ausmaß einer durch Haloperidol induzierten kataleptischen Reaktion beeinflussen, wurden unlängst entdeckt [340].

Für die Auswahl geeigneter Mausstämme war entscheidend, daß es sich um *Inzucht*stämme handelte, daß diese sich deutlich in ihrer MPTP-Anfälligkeit unterscheiden, daß über ihre genomische Ausstattung hinreichend Informationen vorliegen und daß geeignete Mikrosatellitenmarker zur Verfügung stehen mußten. Anhand dieser Kriterien wurden der im MPTP-Modell oft untersuchte Stamm C57BL/6, der sich in den meisten Stammvergleichen als ausgesprochen anfällig erwiesen hat, und der ebenfalls häufig benutzte, aber anscheinend wesentlich MPTP-resistentere Stamm BALB/c ausgewählt. Es sollten beide Geschlechter untersucht werden, da sie ja einerseits beide an der Züchtung von F1- und F2-Generation beteiligt sind und andererseits dadurch auch neue Informationen über Weibchen gewonnen werden können, die im MPTP-Modell bisher eher selten untersucht worden sind.

Es wurde eine Phänotypisierung auf mehreren Ebenen angestrebt. Bezüglich der Selektion von Verfahren zur Untersuchung von Verhaltensänderungen waren mehrere Kriterien wichtig: Einerseits sollte mehr als nur ein Symptom untersucht werden, dann sollten Testverfahren eingesetzt werden, die sich bereits bewährt haben, andererseits die Untersuchung auch auf bisher unbearbeitete Fragestellungen ausgeweitet werden, und schließlich war auch entscheidend, daß die Tests - wegen der großen Zahl zu untersuchender Individuen - leicht und mit vertretbarem Zeitaufwand durchführbar waren. Es wurden sechs Testverfahren ausgewählt:

- Das Offenfeld ist der meistbenutzte Test im MPTP-Mausmodell, und in ihm gewonnene motorische Aktivitätsparameter sind sensitiv für Veränderungen in der nigrostriatalen Aktivität.
- Der Pole-Test wurde gewählt als ein Verfahren, das spezifisch zur Erfassung von Bradykinesie in der MPTP-behandelten Maus entwickelt worden ist [317].
- Das Rotarod ist ein klassisches Verfahren zur Bestimmung des motorischen Koordinationsvermögens [223].
- Mit einem Greif-Test wurde ein Verfahren in die Testbatterie aufgenommen, das motorische Koordinationsleistung an einem Drahtseil prüft. Da die Tiere die Tendenz haben, sich auf das Drahtseil aufzuschwingen und sich darauf fortzubewegen [165], befindet sich bei der von uns verwendeten Version je eine Plattform an den beiden Enden des Drahtes, deren Erreichen ein Zielkriterium darstellt (ähnlich dem sogenannten "tightrope test" [275]).
- Das Nestbauverhalten ist nach Kenntnisstand des Autors in MPTP-behandelten Mäusen bisher nicht untersucht worden. Es wurde für die vorliegende Arbeit gewählt, da es ein Verhalten darstellt, das intakte Mäuse bei Vorhandensein von geeignetem Material spontan ausüben [380,381] und das ferner nicht erst in einer spezifischen Testsituation, sondern bereits im Heimkäfig zu beobachten ist. Darüber hinaus deutete sich in einer Arbeit an, daß eine Mausmutante (*weaver*) mit striatalem DA-Mangel zum Bau eines kompletten Nests mehr Zeit benötigte als der Wildtyp [51].
- Mit dem "Elevated Plus-Maze" (kurz: "Plus-Maze"; zu deutsch etwa: "erhöhtes Plus-Labyrinth") wurde schließlich auch ein weitverbreiteter Test zur Messung von Emotionalität eingesetzt [31,176]. Dies ist geschehen, da einerseits unseres Wissen keine Informationen zur etwaigen Wirkung von MPTP auf diese Verhaltensdomäne vorliegen, andererseits aber einige empirische Befunde für eine Einfluß von Dopaminsystemen auf Emotionalität sprechen [347,403], so daß eine Überprüfung dieser Frage sinnvoll erschien.

Auf der neurochemischen Ebene sollten Dopamin- und andere Monoamin-Konzentrationen *post mortem* im Neostriatum und im ventralen Striatum mittels HPLC bestimmt werden, und schließlich sollten eventuelle histologische Veränderungen (Zellverlust) in Substantia nigra und VTA erfaßt werden.

Die Absicht war, durch dieses Mehrebenen-Vorgehen den Phänotyp "MPTP-Suszeptibilität" möglichst umfassend zu erheben. Entsprechend der QTL-Logik war es erforderlich, den in der Literatur beschriebenen Stammunterschied zwischen C57BL/6 und BALB/c zunächst durch

eigene Überprüfung zu bestätigen. Anschließend wurden reziproke F1- und F2-Generationen erzeugt und ebenfalls mit den genannten Methoden hinsichtlich ihrer MPTP-Anfälligkeit phänotypisiert. Schließlich ist geplant, eine Genotypisierung vorzunehmen, so daß eine QTL-Analyse durchgeführt werden kann. Endziel dieses Projektes ist es, Vererbungscharakteristika für MPTP-Suszeptibilität zu bestimmen und dafür relevante QTLs zu identifizieren.

Das Gesamtprojekt wurde bzw. wird realisiert in Kooperation mit dem Labor für Molekulare Neurogenetik an der Universität Düsseldorf (PD Dr. Auburger), mit dem zusammen Versuchsplanung und Datengewinnung zum Phänotyp durchgeführt wurden, sowie mit dem Labor von Prof. Dr. Belknap an der Oregon Health Sciences University (Portland, USA), das über langjährige Expertise in der Durchführung von QTL-Mapping-Studien verfügt und in dem die Genotypisierung der phänotypisierten Tiere und die QTL-Analyse ausgeführt werden soll. Da die Phänotypisierung auf den Ebenen Verhalten, Neurochemie und Histologie maßgeblich am Institut für Physiologische Psychologie I der Universität Düsseldorf (Prof. Dr. Huston) bzw. unter dessen Federführung stattgefunden hat und dieser Bereich die zentrale Domäne der Physiologischen Psychologie ist, werden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Vorgehen und Ergebnisse bezüglich der Phänotypisierung dargestellt. Da die gesamte Datenerhebung in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Katja Hofele (Labor PD Dr. Auburger) erfolgte, sind einige der hier präsentierten Daten zur Parental- und F1-Generation auch in ihrer Dissertation [198] zu finden, sie sind dort aber in einem anderen Bezugrahmen behandelt worden.

2.2 Fragestellungen

Der Aufbau der vorliegenden Arbeit richtet sich nach der Logik der in Abschnitt 2.1 skizzierten QTL-Studie und ist durch die aufeinanderfolgende Untersuchung von 3 Generationen klar in einzelne Abschnitte gegliedert. Da das gesamte Projekt explorativen Charakter hat, werden nur in wenigen Fällen gerichtete Hypothesen formuliert. Abb. 4 gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf der Kreuzung.

Vorversuch

Vor Durchführung der eigentlichen Experimente wurde eine Stichprobe von unbehandelten Mäusen beider Parentalstämme (C57BL/6 und BALB/c) und Geschlechter mit den genannten Methoden (ausgenommen die Untersuchung des Nestbaus) untersucht. Ziel war es, Durchführungsroutinen für die Testverfahren zu etablieren, Basalwerte als Entscheidungshilfe für die

Optimierung von Versuchsprozeduren zu ermitteln und die Ergebnisse dahingehend zu betrachten, ob sie prinzipiell mit Angaben in der einschlägigen Literatur übereinstimmten.
Die Ausformulierung gezielter Fragen erfolgt daher nicht.

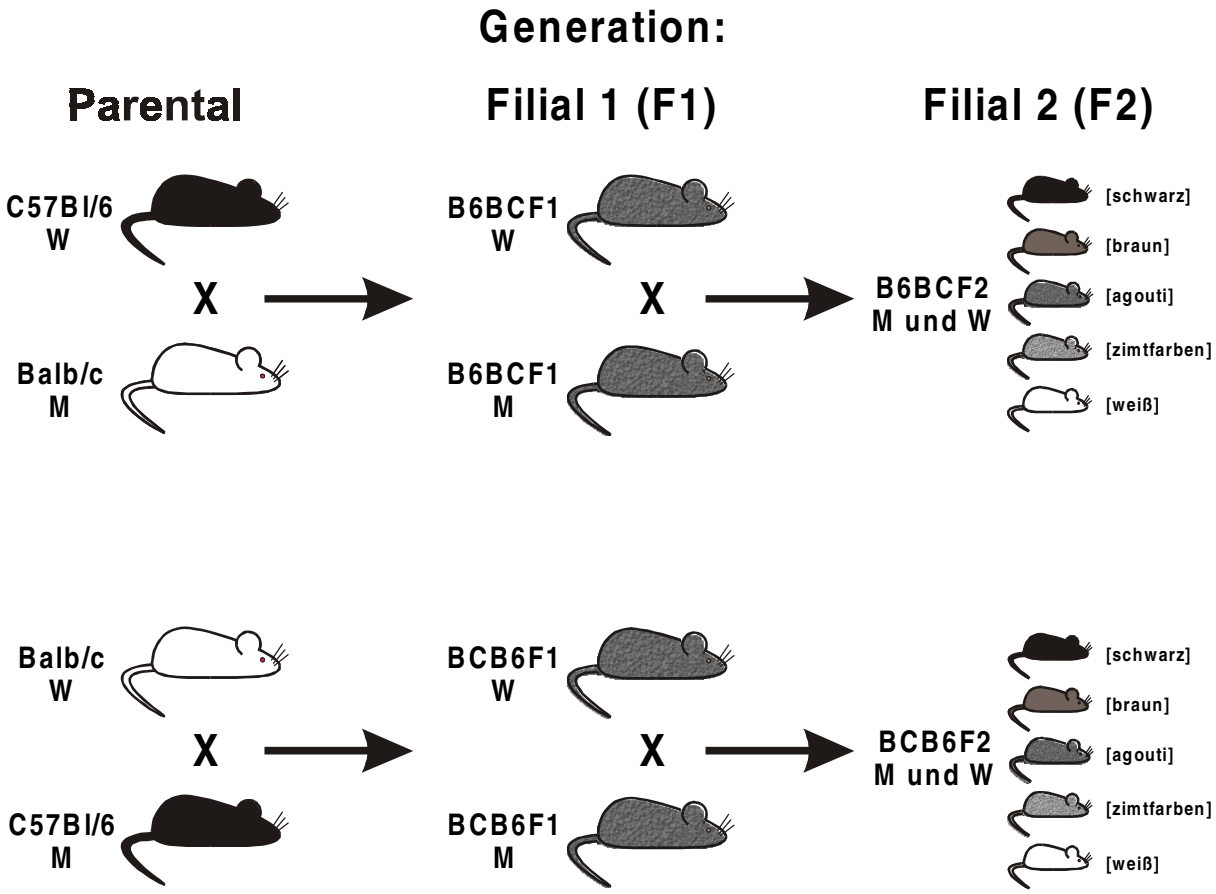

Abb. 4. Züchtungsschema. Die Darstellung gibt den prinzipiellen Ablauf der reziproken Züchtung von den Parentalstämmen (das sind C57BL/6 und BALB/c) bis zur F2-Generation wieder. Das Kreuz symbolisiert die Verkreuzung übereinanderliegender Weibchen (W) und Männchen (M), der Pfeil weist auf die resultierende Nachkommenschaft. Die verkleinerte Darstellung der F2-Tiere dient nur der besseren Übersichtlichkeit. In eckigen Klammern sind die verschiedenen beobachtbaren Fellfärbungen in der F2-Generation angegeben, die einzelnen Typen treten jedoch realiter in unterschiedlichen Häufigkeiten auf. Zur Genetik der Fellfärbung siehe Abschnitt 4.4.1. Die Benennung der F1- und F2-Stämme folgt der gebräuchlichen Nomenklatur, wonach der Name aus einem Kürzel für den Stamm des Weibchens und dann des Männchens der Elterngeneration gebildet wird.

Parentalgeneration

In dieser Etappe wurden Tiere beider Parentalstämme und Geschlechter mit MPTP bzw. Vehikel (Kochsalzlösung) behandelt. Im Vordergrund stand die Frage, ob sich die in der Literatur berichteten unterschiedlichen MPTP-Suszeptibilitäten dieser Inzuchtstämme, gemessen anhand von neuralen Parametern, replizieren ließen. Ferner war von Interesse, ob sich derartige Unterschiede auch auf der Verhaltensebene finden ließen; zwar gab es spärliche Hinweise

auf die Existenz von Verhaltensunterschieden nach MPTP-Gabe zwischen Stämmen [189], dies ist unseres Wissens nach bisher aber nur in einer anderen Arbeit experimentell überprüft worden [332], so daß diesem Aspekt in der vorliegenden Arbeit große Bedeutung beigemessen wurde. Zu Beginn dieser Projektphase stellte sich heraus, daß das aus der Literatur übernommene MPTP-Dosierungschema zu starker, geschlechtsabhängiger Letalität führte, so daß ein geeignetes Schema gefunden werden mußte.

Folgende Fragen sollten in diesem Projektstadium beantwortet werden:

- Welches MPTP-Dosierungschema erzeugt nigrostriatale Läsionen in den gewählten Stämmen bei niedriger Sterberate?
- Sind Mäuse vom Stamm C57BL/6, gemessen an striatalem Dopamin- und Zellverlust, MPTP-anfälliger als BALB/c-Tiere?
- Falls ja: Treten zwischen den Stämmen auch unterschiedlich starke Verhaltensdefizite auf, und mit welchen Testverfahren sind sie nachweisbar?
- Unterscheiden sich Männchen und Weibchen in ihrer Anfälligkeit für MPTP?

F1-Generation

Die Ergebnisse aus der Parentalgeneration bestätigten die angenommenen Stammunterschiede bezüglich der MPTP-Anfälligkeit. Daher wurden reziproke F1-Generationen gezüchtet und mit der gleichen Phänotypisierungsbatterie wie die Parentaltiere getestet. Da bis zur Durchführung dieser Etappe nach unserem besten Wissen keine derartige Studie publiziert worden war und die potentiellen Vererbungsmodi völlig unbekannt waren, konnte vorab keine Hypothese formuliert werden. Die Fragen, die an diesen Teil der Studie gerichtet wurden, lauteten deshalb:

- Wie verhält sich der Grad der MPTP-Anfälligkeit in der F1-Generation zu den Parentalstämmen?
- Unterscheiden sich die reziproken Kreuzungen in ihrer MPTP-Anfälligkeit, d.h. gibt es Anhaltspunkte für geschlechtsgebundene Vererbungswege?

F2-Generation

Der Phänotyp der F2-Generation wurde mit der gleichen Methodik wie in den vorangegangenen Experimenten in einer großen Zahl von Individuen bestimmt. Besonderes Gewicht lag in diesem Untersuchungsabschnitt auf der Verteilung der Werte, weil die F2-Generation genetisch heterogen ist und die Phänotypen der einzelnen Tiere die Basis der QTL-Analyse bilden. Als ausreichende Stichprobengröße für eine grobe QTL-Detektion wird in der Literatur n=250

genannt [255], was inzwischen auch mehrfach erfolgreich demonstriert worden ist [122,435]; dennoch wurde beschlossen, daß der Umfang unserer Stichprobe zur Sicherheit mindestens 20% darüber liegen sollte (d.h. n≥300).

Eine leicht erkennbare Folge der durch die Züchtung erzeugten genetischen Variation ist das Auftreten unterschiedlicher Fellfärbungen. Da die Pigmentierung seit vielen Jahren in Verbindung mit der MPTP-Anfälligkeit gebracht worden ist, sollte deren Bedeutung geprüft werden. Aus diesen Überlegungen ergaben sich die nachfolgenden Fragen:

- Welche Verteilung weisen die phänotypischen Variablen auf?
- Sind pigmentierte Tiere MPTP-anfälliger als unpigmentierte?

Folgeuntersuchung 1: Tyrosinase

Eine vorläufige Analyse des Zusammenhangs zwischen Pigmentierung und MPTP-Suszeptibilität in der F2-Generation erbrachte einen Hinweis auf einen solchen Zusammenhang. Daher wurde diese Frage in einer Folgestudie noch gezielter überprüft, indem Männchen des C57BL/6-Stamms (=Wildtyp) mit einer Mutante verglichen wurde, die sich nur in einem Gen vom Wildtyp unterschied (man spricht von sogenannten koisogenen Stämmen [264]), nämlich dem Gen für das Enzym Tyrosinase. Die Abwesenheit dieses Enzyms bewirkt das Fehlen des Pigmentfarbstoffs Melanin (Albinismus). Die entscheidende Frage lautete:

- Ist der pigmentierte Stamm C57BL/6 MPTP-anfälliger als der Stamm, der eine Tyrosinase-Mutation trägt und deshalb unpigmentiert ist?

Folgeuntersuchung 2: Letalität

Ein Phänomen in der F2-Generation war eine auffallend hohe Letalität unter den Weibchen (ca. 30%). Aufgrund pathologischer Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, daß dies mit dem im Vergleich zu Männchen höheren Östrogenspiegel der Weibchen zusammenhängt und somit zyklusabhängig ist. Es wurden deshalb Weibchen im Östrus (=hoher Östrogenspiegel) vs. Diöstrus (=niedriger Östrogenspiegel) mit MPTP behandelt und die Letalität dieser beiden Gruppen verglichen, um folgende Frage zu beantworten:

- Ist die Letalitätsrate höher in der Gruppe, die im Östrus behandelt wurde, als in der im Diöstrus behandelten Gruppe?

3 Material und Methoden

3.1 Tiere und Tierzucht

Alle Tiere für die beschriebenen Experimente, ausgenommen diejenigen für die Folgeuntersuchung 1, wurden von der Tierversuchsanlage (TVA) der Universität Düsseldorf bezogen, wo sie geboren und aufgezogen worden waren. Es handelte sich um 8-10 Wochen alte Männchen und Weibchen der Stämme C57BL/6JIbm und BALB/cJIbm; ursprünglicher Lieferant der Stämme war RCC, Itingen, Schweiz. Für das in dieser Arbeit beschriebene Projekt wurden in der TVA zu vorher abgestimmten Zeitpunkten eigens F1- und F2-Hybride dieser Stämme gezüchtet. Dazu wurden nach einem reziproken Züchtungsprotokoll einzelne Paare von C57BL/6-Weibchen mit BALB/c-Männchen verpaart, um B6BCF1-Tiere zu züchten bzw. BALB/c-Weibchen mit C57BL/6-Männchen verpaart für die Zucht von BCB6F1-Tieren. Individuen dieser Kreuzungen wurden wieder getrennt nach Teilkreuzung miteinander verpaart, um die Kreuzungen B6BCF2 und BCB6F2 zu erzeugen. Die Benennung der F1- und F2-Stämme folgte der gebräuchlichen Nomenklatur, wonach der Name aus einem Kürzel für den Stamm des Weibchens und dann des Männchens der Elterngeneration gebildet wird (siehe [125] und www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml). Für die Folgeuntersuchung 1 wurden C57BL/6J-Mäuse und koisogene C57BL/6J-*Tyr*$^{c\text{-}2J}$-Mutanten von einem externen Lieferanten bezogen (siehe Punkt 4.5.2 für Details).

3.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden jeweils wenige Tage vor Beginn des Experiments aus den Zuchträumen, wo sie mit ihren Wurfgenossen zusammen gehalten worden waren, in einen Haltungsraum gebracht und dort unter einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus (zeitgeschaltete Leuchtstoffröhren) bei einer Umgebungstemperatur von 25±2°C in Einzelkäfigen (ca. 26 x 20 x 14 cm) mit freiem Zugang zu Nagetierfutter (Sniff R/M, Soest) und Wasser gehalten. Drei Tage vor Experimentbeginn wurde jedes Tier mehrere Minuten gehändelt, um es an die Handhabung durch die Experimentatoren zu gewöhnen, gewogen (Tierwiegemodus, Mettler-Toledo PB 801, Giessen) und mittels eines farbigen Strichcodes am Schwanz markiert; abschließend wurde das Geschlecht der Tiere verifiziert.

3.3 Substanzen und Injektion

3.3.1 Substanzen und Injektion

MPTP-HCl (RBI, Köln) wurde in physiologischer Kochsalzlösung (KSL) gelöst und intraperitoneal (i.p.) appliziert[4]. In Abständen von zwei Stunden erfolgten insgesamt 4 Injektionen von jeweils 15 mg MPTP-HCl/kg Körpergewicht (MPTP4x15). In einigen Tieren der Parentalgeneration wurden abweichende Dosierungsschemata benutzt, siehe dazu Abschnitt 4.2.2. Die Verabreichung erfolgte in einem Volumen von 10 ml/kg Körpergewicht. Kontrolltiere wurden mit entsprechenden Mengen von KSL behandelt. Die Zuordnung der Tiere zu den Kontroll- oder Experimentalgruppen erfolgte nach Zufall.

3.3.2 Sicherheitsmaßnahmen

Da die Intoxikation mit MPTP beim Menschen ein Parkinson-Syndrom auslösen kann, was neben Drogenabhängigen, die sich MPTP-verunreinigte Stoffe intravenös injiziert haben, möglicherweise auch bei Chemikern, die diese Substanz synthetisiert haben, geschehen ist [248], müssen beim tierexperimentellen Einsatz geeignete Sicherheitsmaßnahmen getroffen werden, um das Risiko einer Gefährdung von Experimentatoren zu minimieren. Dazu gehört als erstes, daß nicht die leichtflüchtige freie Base, sondern das nichtflüchtige Salz MPTP-HCl verwendet wird, das zudem gut wasserlöslich ist [207]. Wie von Pitts et al. empfohlen, erfolgte die Herstellung der MPTP-Lösung möglichst rasch unter einem Abzug und mit geeigneter Schutzkleidung (Kittel, Latex-Handschuhe, Mundschutz) und Schutzbrille [330]. Da in den ersten 48 Stunden nach Injektion von Mäusen ein Teil der injizierten Substanz in Kot und Urin wieder ausgeschieden werden kann [466], wurden alle Verhaltensuntersuchungen grundsätzlich ebenfalls mit der erwähnten Schutzkleidung durchgeführt. Die Entsorgung kontaminierten Materials (Käfigeinstreu, Handschuhe, Wischtücher, Spritzen etc.) erfolgte durch Hochtemperaturverbrennung; Restmengen von gelöstem MPTP-HCl wurden in schwefelsaurer Kaliumpermanganatlösung unschädlich gemacht [330].

[4] Nachfolgend wird in dieser Arbeit vereinfachend nur von "Kochsalzlösung" bzw. "KSL" gesprochen. Damit ist stets eine physiologische Kochsalzlösung (0.9% NaCl in H_2O) gemeint.

3.4 Verhaltensmessungen

Allgemeine Prozeduren

Um keine Käfige mit eventuell MPTP-kontaminierter Einstreu zu transportieren, wurden die Tiere vor Beginn der Verhaltensmessungen von ihrem Heimkäfig einzeln in Transportkäfige überführt, die bis auf die fehlende Streueinlage gleich beschaffen waren wie die Heimkäfige. Die Mäuse wurden manuell am Schwanz nahe der Schwanzwurzel angefaßt und rasch von einem Käfig in den anderen gehoben. Die Transportkäfige wurden dann mit einem Wagen vom Haltungsraum in einen benachbarten Raum befördert, in dem (mit Ausnahme der Untersuchung des Nestbaus) alle Verhaltenstestungen erfolgten. Vom Transportkäfig wurden die Tiere dann in die einzelnen Testapparaturen gesetzt. Nach Abschluß der Verhaltenstests wurde umgekehrt verfahren. Alle Testapparaturen wurden nach jedem Tier mit stark verdünnter Essigsäurelösung (0.2%) gesäubert und sorgfältig trockengewischt. Bei jedem Tier wurden für jeden Test die Uhrzeit, Testergebnisse und etwaige Besonderheiten auf einem Testbogen protokolliert. Mit Ausnahme des Offenfeld- und des Nestbauverhaltens wurden alle Testabläufe mittels einer Videoausrüstung dokumentiert. Abbildung 5 stellt die Abfolge der Testprozeduren bis zur Hirnentnahme schematisch dar.

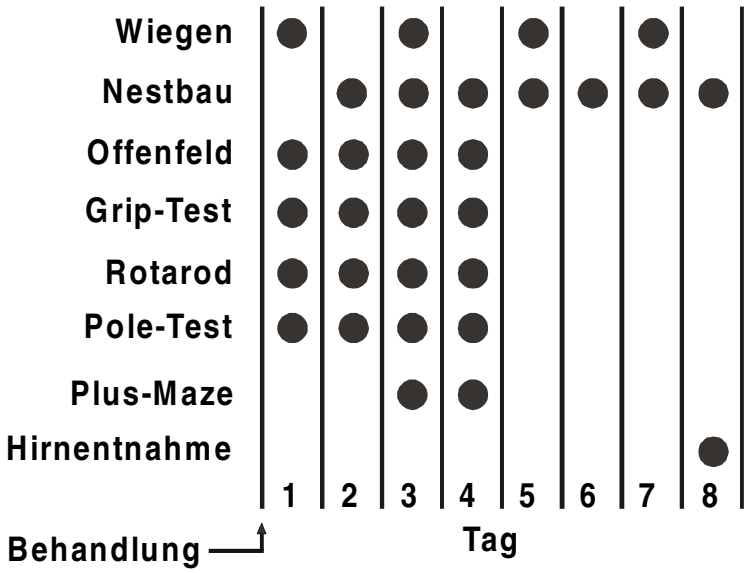

Abb. 5. Testablaufschema. "Behandlung" kennzeichnet die Injektion von MPTP oder Kochsalzlösung (KSL). Die Reihenfolge der Datenerhebung mittels der einzelnen Prozeduren entspricht innerhalb eines Testtages deren Position von oben nach unten. Unmittelbar vor der Hirnentnahme an Tag 8 wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet.

Um Reihenfolgeeffekte zu kontrollieren, erfolgte innerhalb eines Experiments (gemeint ist z.B. die Untersuchung der gesamten Parentalgeneration) eine systematische Variation der Reihenfolge der untersuchten Tiere bezüglich der Faktoren Stamm, Geschlecht und Behandlung. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte eine indirekte Beleuchtung des Raumes, indem eine weiße Leuchtstoffröhre auf die Decke gerichtet wurde.

3.4.1 Offenfeld

Apparatur

Für Verhaltensmessungen im Offenfeld wurde ein kommerziell erhältliches System (Truscan, Coulbourn Instruments, Allentown, USA) verwendet, bestehend aus 3 Plexiglasboxen (26x26x39 cm), mit dem drei Tiere simultan untersucht werden können. Durch die Boxen werden auf zwei Ebenen (Abstand vom Boden 2.5 und 6 cm) in x- und y-Richtung Infrarotstrahlen zu gegenüberliegenden Sensoren geschickt. Die Sensor-Daten werden über eine Schnittstelle an einen herkömmlichen PC übermittelt; die Position und daraus resultierend die Bewegungsaktivität eines im Offenfeld befindlichen Tieres wird aus den Mustern der Unterbrechung der Strahlen mittels der Truscan-Software errechnet; dabei ist die Ausgabe einer Vielzahl von Parametern möglich. Die Beleuchtungsstärke betrug am Boden der Offenfelder ca. 30 Lux.

Durchführung

Jeweils drei Mäuse wurden gleichzeitig getestet, d.h. eine Maus pro Meßstation. Die Tiere wurden in die Mitte der Box gesetzt, mit dem Gesicht in Richtung der Rückseite der Box; dann wurde eine 10-minütige Messung per Computer gestartet. Nach Ende der Messung wurden die Tiere wieder in den Transportkäfig zurückgebracht. Abschließend wurde die Anzahl der im Offenfeld hinterlassenen Fäkalboli bestimmt und protokolliert.

3.4.2 Greif-Test

Apparatur

In einem oben offenen Kasten aus grauem PVC (120 x 40 cm) war zwischen zwei vertikalen Pfosten ein Edelstahldraht (Durchmesser 1 mm) in 20 cm Abstand vom Boden gespannt. Auf

jedem der beiden Pfosten war eine Plattform (5 x 5 cm) mit einer griffigen weißen Schaumstoffbeschichtung angebracht. Die Beleuchtungsstärke betrug in Höhe des Drahtes ca. 30 Lux.

Durchführung

Die Maus wurde mit den Vorderpfoten in der Mitte des Drahtseils angehängt, und es wurde die Zeit bestimmt, nach der ein Tier entweder herunterfiel oder die Plattform erreicht hatte. Falls innerhalb von 120 s keine der beiden Möglichkeiten eingetreten war, wurde der Test beendet.

3.4.3 Rotarod

Apparatur

Das Gerät bestand aus einer mit schwarzem Gummi beschichteten Walze (Geschwindigkeit 12 Umdrehungen/Minute; Durchmesser 2.5 cm). Die Beleuchtungsstärke betrug auf Höhe der Walze ca. 30 Lux.

Durchführung

Die Maus wurde auf die stehende Walze gesetzt und diese Walze dann in Drehbewegung gesetzt. Es wurde die Zeit erfaßt, die das Tier auf der Walze verbracht hat. Die maximale Beobachtungszeit betrug 120 s, danach wurde der Testdurchgang beendet.

3.4.4 Pole-Test

Apparatur

Diese Apparatur bestand aus einer 50 cm hohen, Gaze-umwickelten vertikalen Stange (Durchmesser 1 cm) mit einem Korkball (Durchmesser 1.5 cm) an der Spitze. Sie war umgeben von einer 30 cm hohen grauen Wand aus PVC, die an einer Seite aus durchsichtigem Plexiglas bestand, so daß die Videoaufzeichnung von der Seite erfolgen konnte. Die Beleuchtung erfolgte durch eine auf die Stangenspitze gerichtete und indirekt durch zwei an die Decke strahlende Rotlichtlampen (25 Watt); die resultierende Beleuchtungsstärke an der Spitze der Stange betrug etwa 1 Lux.

Durchführung

Die Maus wurde mit dem Kopf nach oben direkt unterhalb des Korkballs plaziert und losgelassen, sobald sie die Stange ergriffen hatte. Es wurde die Zeit bestimmt, die das Tier benötigte, sich um 180° zu drehen und den Boden mit allen vier Pfoten zu betreten. Erfolgte dies nicht innerhalb von 120 s, wurden der Testdurchgang beendet und die maximale Testzeit von 120 s protokolliert. Für den äußerst selten auftretenden Fall, daß ein Tier herunterfiel oder herunterrutschte, wurde dies ebenfalls mit 120 s gewertet, da die erforderliche Verhaltensweise des kontrollierten Drehens und Kletterns nicht geleistet wurde. Dieses Vorgehen entspricht demjenigen von Matsuura et al. [281]. In einigen Gruppen wurden nachträglich mittels der Videoaufzeichnungen auch die Latenz bis zur ersten Bewegung nach Aufsetzen auf die Stange und die Anzahl der 180°-Drehungen auf der Stange bestimmt.

3.4.5 Nestbau

Durchführung

Am Tag der Behandlung mit MPTP respektive Kochsalzlösung wurde in den Heimkäfig auf den Boden, der mit Einstreu bedeckt war, ein gefaltetes Zellstofftuch (Hartmann, Heidenheim) gelegt; dieses konnte von den Tieren als Ausgangsmaterial für den Bau eines Nestes verwendet werden [381]. Täglich, beginnend mit dem Tag nach der Injektionsbehandlung, wurde vor Beginn der anderen Testungen überprüft, ob Nestbau eingesetzt hatte. Dies wurde definiert als Auftreten von Reiß- und/oder Beißspuren, und die Latenz (in Tagen) bis zum ersten Auftreten solcher Spuren wurde im Protokoll festgehalten.

3.4.6 Elevated Plus-Maze

Apparatur

Hierbei handelte es sich um ein kreuzförmiges, ca. 40 cm über dem Boden angebrachtes Labyrinth, bei dem zwei der vier Arme (Breite 5 cm, Länge 29 cm) durch Wände (Höhe 15 cm) gesichert sind ("geschlossene" Arme), wogegen die beiden anderen Arme keine derartige Sicherung besitzen ("offene Arme"). Das Zentrum hat eine Ausdehnung von 5 x 5 cm. Die Dimensionen entsprechen denen bei Lister [265]. Die Beleuchtung erfolgte indirekt durch zwei

an die Decke strahlende Rotlichtlampen (25 Watt); die resultierende Beleuchtungsstärke im Zentrum des Plus-Maze betrug etwa 0.3 Lux.

Durchführung

Die Tiere wurden in das Zentrum mit Blickrichtung auf einen offenen Arm gesetzt. Die Testdauer betrug 5 Minuten, danach wurde das Tier aus der Apparatur genommen. Für den selten auftretenden Fall, daß ein Tier vom offenen Arm herunterfiel, wurde es vom Experimentator umgehend wieder auf die Stelle gesetzt, von wo es gefallen war. Mittels der semiautomatischen Auswertungssoftware Chromotrack 4.0 wurden anhand der Videoaufzeichnung die Aufenthaltszeiten im offenen bzw. geschlossenen Arm gemessen.

3.5 Neurochemische Untersuchungen

3.5.1 Probengewinnung

Nach Tötung der Tiere mittels zervikaler Dislokation wurde der Schädel rasch mit einer Schere geöffnet und das Hirn für 60 s in eiskalte physiologische Kochsalzlösung getaucht, um es härter und somit besser schneidbar zu machen. Das Hirn wurde danach in eine eiskalte Schneidematrix (1 mm-Raster) für Maushirne gelegt (RBM-2000C, ASI Instruments, Warren, USA) und mit handelsüblichen Rasierklingen eine 1 mm dicke Gewebescheibe anterior zum Chiasma opticum herausgetrennt, aus der unter Verwendung eines Standardatlanten des Mausgehirns [135] auf einem gekühlten Objektträger beidseitig Neostriatum und ventrales Striatum herausgeschnitten wurden. Linke und rechte Hälfte eines Hirngebietes wurden jeweils zusammen in ein Eppendorfgefäß (1.5 ml) gegeben, das 500 ml einer 0.05-molaren Dihydroxybenzylamin-(DHBA)-Perchlorsäurelösung enthielt, und die Probengewichte auf einer Feinwaage (Sartorius, Göttingen) bestimmt. Es folgte eine 20-sekündige Homogenisierung der Proben mit einer Ultraschallsonde (Kontes K-881430, Vineland, USA), um die Zellwände zu sprengen und intrazelluläre Transmitter in Lösung zu bringen, und Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen/Minute für 20 min bei 4°C (Sarstedt MH2-K, Nümbrecht), die zu einer Trennung in festen Bodensatz ("Pellet") und den flüssigen Überstand führte. Der Überstand wurde abschließend mittels einer 2-minütigen Zentrifugation (Tischzentrifuge BAS MF-C 412, Lafayette, USA) durch Mikrofilter (RC 58, 0.2 µm Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel) filtriert.

3.5.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde der Gehalt der Neurotransmitter DA, 5-HT, NA sowie der Metaboliten DOPAC, 3-MT, und HVA im Überstand quantitativ bestimmt. Als interner Standard wurde DHBA verwendet. Die stationäre Phase bestand aus einer 12.5 cm langen, C_{18}-Alkan-Ketten-gepackten Säule (ET 125/4 Nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel). Die mobile Phase bestand aus 0.15 M Monochloressigsäure, 0.117 M Natriumhydroxid, 0.861 mM Octylsulfat, 0.672 mM EDTA, 3.5% (v/v) Acetonitril und 0.236 M Tetrahydrofuran. Das System bestand aus einer Pumpe (LKB 2150, Bromma, Schweden), Zellensystem (BAS CC-4, Lafayette, USA) mit Detektor (BAS LC-4) und Integrator (Shimadzu CR-6A, Duisburg).

Zur Bestimmung der spezifischen Retentionszeiten und Eichung der elektrochemischen Meßzelle (Detektionspotential +0.700 V) wurde zu Beginn jedes Analysetages eine Standardlösung (je 50 ng/ml aller zu messenden Substanzen sowie DHBA in 0.05 M Perchlorsäure) zweimal aufeinanderfolgend analysiert. Die Retentionszeiten wurden kontrolliert und vom nachgeschalteten Integrator die spezifischen Faktoren für jede Substanz berechnet. Jeweils 50 ml des gefilterten Überstandes einer Probe wurde in die Anlage injiziert und analysiert. Der Fluß der Pumpe betrug 1 ml/Min.

Die gesamte neurochemische Untersuchung entspricht mit minimalen Änderungen einer am Institut seit vielen Jahren gebräuchlichen Prozedur zur *post mortem* Analyse von Monoaminen [369]. Für weitere Details zu Aufbau und Funktionsweise von HPLC-Anlagen siehe [370,424].

Die Ergebnisse der neurochemischen Untersuchungen wurden auf das Gewicht der entsprechenden Gewebeprobe bezogen und ausgedrückt als Gehalt von Neurotransmittern in ng/mg feuchtes Hirngewebe. Zur Vergleichbarmachung von neurotoxischen Effekten über Stämme und Generationen hinweg wurde für den Transmitter Dopamin zusätzlich die Depletion, d.h. der Verlust in Prozent gemessen am Mittelwert der entsprechenden KSL-behandelten Kontrollgruppe, bestimmt; hierbei erfolgte die Berechnung grundsätzlich für beide Geschlechter getrennt.

3.6 Histologische Untersuchungen

3.6.1 Immunhistochemische Präparation

Der posterior zum Chiasma opticum gelegene Teil des Gehirns wurde in Bouin-Lösung (Sigma, Deisenhofen) fixiert und in Paraffin eingebettet. Das Gewebe wurde im Abschnitt von 0.88 bis 0.28 mm anterior zur interauralen Linie in 10-µm-Schritten koronal geschnitten und auf Glasträger aufgebracht. Bei jedem zehnten Schnitt, d.h. in Schritten von 100 µm, wurde eine indirekte Immunhistochemie unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen Tyrosin-Hydroxylase (Verdünnung 1:5000; Sigma) durchgeführt. Anschließend wurde die Immunoreaktivität mit Hilfe des DAB Chromogen-Systems (Immunotech) sichtbar gemacht, eine Gegenfärbung vorgenommen und die Schnitte zum Schluß auf Objektträgern eingedeckelt. Für eine detailliertere Beschreibung der Präparation siehe [198].

3.6.2 Zellzählung

Die immunhistochemisch behandelten Koronalschnitte wurden lichtmikoroskopisch (400-fache Verstärkung) auf das Vorhandensein von TH-immunoreaktiven Zellen im Bereich der pars compacta der Substantia nigra sowie des ventralen tegmentalen Areals (VTA) untersucht. Alle markierten Zellen in der SN und VTA wurden gezählt, definiert als TH-immunopositives Soma mit oder ohne sichtbaren Nukleus. Die Grenze zwischen SN und VTA wurde anhand der regionspezifischen Zellverteilung und -ausrichtung unter Verwendung eines Standardatlanten des Mausgehirns [135] gezogen. Schließlich wurde - getrennt nach SN und VTA - pro Tier ein Mittelwert der gezählten Zellen über die Anzahl der ausgewerteten Schnitte hinweg gebildet.

3.7 Gewebeentnahme zwecks genetischer Analyse

Nach der zervikalen Dislokation wurden in der Parental-, F1- und F2-Generation auch Schwanzgewebe sowie die Leber der Tiere entnommen und getrennt in kältesicheren Probengefäßen bei -60°C gelagert. Dieses Vorgehen wird hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt, da die (noch nicht durchgeführte) Extraktion von DNS aus diesem Gewebe und deren anschließende Charakterisierung mit Mikrosatellitenmarkern molekulargenetische Untersuchungen darstellen, die nicht Teil der vorliegenden Arbeit, aber notwendige Arbeitsschritte für die geplante QTL-Analyse sind.

3.8 Datenauswertung und Statistik

Die Datendarstellung erfolgte in allen Experimenten deskriptiv anhand von Mittelwerten und Standardfehlern. Die Verhaltensdaten wurden wie folgt analysiert: Die zeitlichen Verlaufskurven von wiederholt erhobenen Meßwerten für die Lokomotion im Offenfeld wurden so behandelt, daß für die Kurven mittels der von Krauth [235] beschriebenen Methode die lineare Trendkomponente a_1 errechnet wurde. Diese entspricht der normalen Steigung einer Regressionsgerade. Für den Kennwert a_1 wurden dann Gruppenvergleiche mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit den Faktoren "Stamm", "Geschlecht" und Behandlung" durchgeführt. Die Daten zum Nestbau wurden mit einem Kontingenztafeltest für geordnete Kategorien ausgewertet [236]; die Kategorisierung erfolgte mittels des Tages (bezogen auf den Tag der Behandlung), an dem in einem Tier erstmalig Nestbau beobachtet wurde, und es wurden so viele Kategorien gebildet, wie unterschiedliche Tage des Nestbaubeginns in den zu vergleichenden Gruppen beobachtet wurden. Die Ergebnisse von Greif-Test, Rotarod, Pole-Test und Elevated Plus-Maze wurden nur deskriptiv anhand der Mittelwerte und Standardfehler dargestellt.

Neurochemische Daten und die Ergebnisse der Zellzählungen wurden wiederum mittels ANOVA mit den Faktoren "Stamm", "Geschlecht" und Behandlung" analysiert. Die Verwendung der Varianzanalyse erfolgte unter der Annahme ihrer relativen Robustheit und in Anlehnung an die Auswertungsmethoden vieler relevanter Arbeitsgruppen, die mit dem MPTP-Mausmodell gearbeitet haben (siehe Referenzen in Kapitel 1.4.3 und 1.4.4). Es ist jedoch anzumerken, daß eine ANOVA-Auswertung aus methodisch-statistischer Sicht nicht unbedingt die beste Methode darstellt (zur Kritik siehe z.B. [237]). Für *post hoc*-Vergleiche wurde Tukey's honest significant difference Test (Tukey's HSD) benutzt. Zudem wurde als Maß für den Zusammenhang zwischen ausgewählten Verhaltens- und neuralen Parametern die Pearsonsche Produkt-Moment-Korrelation verwendet.

In jedem Tier wurde eine Reihe von Verhaltens-, neurochemischen und histologischen Variablen erhoben, in der Absicht, innerhalb einer Versuchsgruppe ein möglichst komplexes Bild über die Auswirkungen des Neurotoxins MPTP zu erhalten. Diese Mehrfachmessungen (anstelle einzelner Messungen in getrennten Individuen) erfolgten aus Gründen der tierexperimentellen Ethik und der praktischen Durchführbarkeit. Dabei tritt jedoch das Problem auf, daß man innerhalb jeder Versuchsgruppe eine beträchtliche Zahl untereinander abhängiger Messungen erhält, die eine Überprüfung der Hypothesen im Sinne möglicher statistischer Signifikanz erschweren.

Um eine Häufung von Signifikanztests zu vermeiden, wurde deshalb in jedem Experiment auf jeder Betrachtungsebene nur ein Parameter signifikanzstatistisch ausgewertet. Die Auswahl

fand vorab anhand des Studiums der einschlägigen Literatur (siehe Kapitel 1.4.3 und 1.4.4) statt. Es handelte sich um die Parameter "Dopaminkonzentration im Neostriatum", "Zahl TH-positiver Zellen in der SN" und "zurückgelegte Distanz im Offenfeld" (bzw. den daraus gebildeten Koeffizienten a_1). Hierzu wurde als Signifikanzgrenze ein p-Wert kleiner als 0.05 zugrunde gelegt; die Angabe von p-Werten erfolgte hinsichtlich zweiseitiger Fragestellungen. Alle übrigen p-Werte wurden als Maß des Effekts deskriptiv interpretiert.
Auf von diesen Beschreibungen abweichende Auswertungsprozeduren wird im Einzelfall in den entsprechenden Abschnitten hingewiesen.

4 Ergebnisse und Einzeldiskussionen

4.1 Vorversuch

4.1.1 Einleitung

Ein Vorversuch mit allen Prozeduren, die zur Phänotypisierung von Parental-, F1- und F2-Generation eingesetzt werden sollten, wurde in einer gesonderten Stichprobe von Tieren durchgeführt. Ziel war es, allgemeine qualitative und quantitative Informationen über Verhaltensweisen zu gewinnen. Dies war nötig, weil die meisten Maus-Verhaltenstestapparaturen eigens für das QTL-Analyse-Projekt angeschafft worden waren und bis dato am Institut zu mehreren Verhaltenstests keine Vorerfahrungen mit der Spezies Maus vorlagen. Zwar existiert eine reiche verhaltensneurowissenschaftliche Literatur zu Mäusen vieler Stämme (zur Übersicht siehe [87]), aber diese kann zunächst nur Richtwerte liefern. Erst kürzlich wurde in einer Multi-Center-Studie nachgewiesen, daß selbst beim Versuch, Laborumwelten und Prozeduren möglichst gut zu standardisieren, bei Tieren gleicher Herkunft einzelne Verhaltensweisen zwischen verschiedenen Laboren konsistent variierten, was darauf hindeutet, daß die Kontrolle aller verhaltensrelevanten Variablen extrem schwierig ist [84]. Unsere Voruntersuchung diente also der Gewinnung von wichtigen laborspezifischen Erfahrungswerten. Hinzu kommt, daß für manche Paradigmen der Rückgriff auf die Literatur gar nicht möglich war, weil z.B. unseres Wissens der Pole-Test bisher nicht mit Weibchen oder BALB/c-Mäusen durchgeführt worden war. Für die neurochemische Analyse gilt, daß diese am Institut für die Untersuchung von Hirngewebe der Ratte bereits sehr gut etabliert war, aber es mußte verifiziert werden, ob die Prozedur zur Analyse von Maushirngewebe ebenso geeignet ist. Schließlich wurde die immunhistochemische Präparation zum Nachweis TH-positiver Neuronen in dieser Vorstudie etabliert. Wegen des Pilotcharakters dieses Experiments erfolgt die Darstellung der Ergebnisse rein deskriptiv.

4.1.2 Durchführung

Versuchstiere waren je 10 Männchen und Weibchen der Maus-Inzuchtstämme C57BL/6JIbm und BALB/cJIbm. Die Tiere erhielten keinerlei Injektionen.

Der Versuchsablauf dieses Vorversuchs entsprach *nicht* dem Ablaufschema aus Abb. 5. Statt dessen wurden die einzelnen Prozeduren innerhalb eines Zeitraums von drei Wochen in dieser Reihenfolge durchgeführt: Offenfeld (3x, jeden 2. Tag), Greif-Test (2x, an aufeinanderfol-

genden Tagen), Pole-Test (2x, an aufeinanderfolgenden Tagen), Rotarod (3x, an aufeinanderfolgenden Tagen), Plus-Maze (2x, an aufeinanderfolgenden Tagen). Zervikale Dislokation und Hirnentnahme erfolgten eine Woche nach dem letzten Test. Außerdem bestanden in folgenden Punkten Abweichungen von den Material- und Methodenangaben in Kapitel 3: Die Verhaltenstests wurden im Haltungsraum durchgeführt, daher fand kein Transport in einen anderen Raum statt. Die Haltung erfolgte nicht in Einzelkäfigen, sondern in Gruppen zu je fünf Tieren von gleichem Stamm und Geschlecht. Die Oberfläche der Rotarod-Walze bestand aus geriffeltem, weißem PVC. Die Beleuchtung erfolgte direkt durch an der Decke angebrachte Leuchtstoffröhren, so daß die Testungen in Offenfeld, Rotarod und Greif-Test bei einer Beleuchtungsstärke von 100-150 Lux erfolgten. Beim Pole-Test wurde zusätzlich ein weißer Halogenstrahler auf die Spitze der Stange gerichtet (Beleuchtungsstärke dort ca. 1000 Lux); der Plus-Maze-Test wurde in einer abgedunkelten Kammer durchgeführt (Beleuchtungsstärke im Zentrum des Plus-Maze ca. 15 Lux).

4.1.3 Ergebnisse

4.1.3.1 Verhalten

Offenfeld

Die Fortbewegung der beiden untersuchten Stämme im Offenfeld (auch als Lokomotion oder horizontale Aktivität bezeichnet) ist in Abb. 6 als die zurückgelegte Strecke innerhalb des 10-minütigen Beobachtungszeitraums dargestellt. Diese Strecke verringerte sich bei den Weibchen des Mausstamms C57BL/6 über die drei Testzeitpunkte hinweg von anfangs ca. 30 Meter auf 22.5 Meter. Bei den Männchen dieses Stammes lag das Aktivitätsniveau insgesamt niedriger (knapp 20 Meter), und es gab nur eine sehr geringe Abnahme von der ersten bis zur dritten Messung. Solche Geschlechtsunterschiede traten bei BALB/c-Tieren nicht zutage, bei denen der Gruppenmittelwert für beide Geschlechter an allen drei Meßzeitpunkten nahezu konstant knapp unter 20 Metern lag.

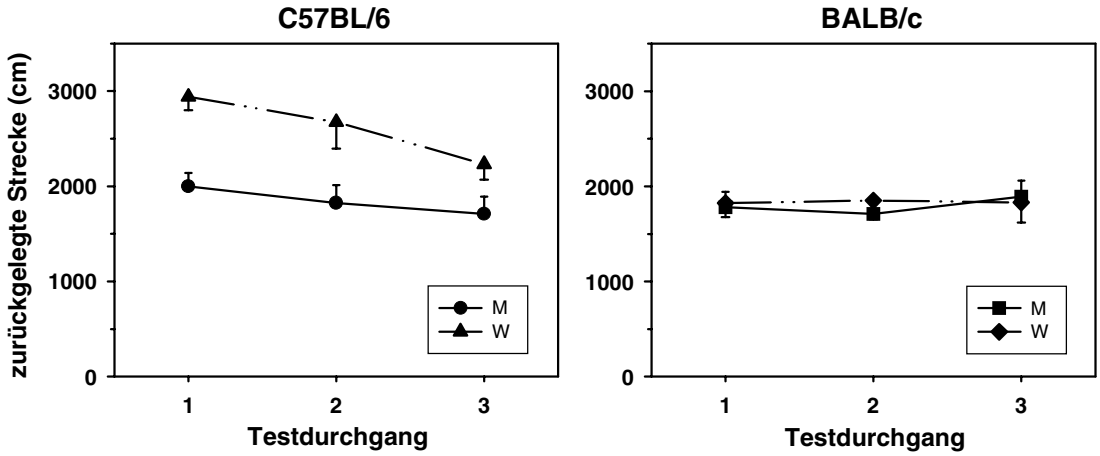

Abb. 6. Zurückgelegte Strecke im Offenfeld (in cm; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c (n=40). Die Testdauer betrug 10 Minuten, die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug zwei Tage.

Ein zusätzlicher Parameter im Offenfeld ist das Ausmaß der Defäkation. Die durchschnittliche Anzahl der Fäkalboli (Abb. 7) lag bei C57BL/6-Männchen etwas höher als bei den Weibchen. In diesem Stamm deutet sich auch ein leichter Trend im Sinne einer Zunahme mit wiederholter Testexposition an. BALB/c-Tiere sonderten insgesamt mehr Boli ab, wobei es in diesem Stamm keine Geschlechtsunterschiede gab.

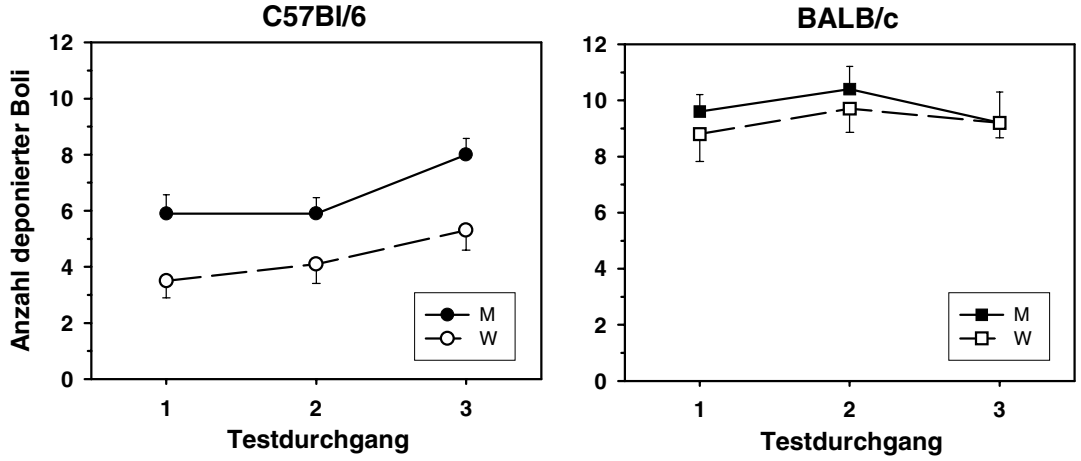

Abb. 7. Anzahl der Fäkalboli, die im Offenfeld deponiert wurden (Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c (n=40). Die Testdauer betrug 10 Minuten, die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug zwei Tage.

Greif-Test

Im Greif-Test wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Verhaltensweisen beobachtet: Die Tiere haben sich entweder

- aufgeschwungen und mit allen vier Pfoten (evtl. unter Einsatz des Schwanzes) am Draht festgeklammert ***oder***
- aufgeschwungen und sich längs des Drahtseils bewegt, sind aber vor Erreichen der Plattform runtergefallen ***oder***
- aufgeschwungen und sich längs des Drahtseils bewegt, aber bei Erreichen der Plattform an deren Ständer zu Boden gleiten lassen ***oder***
- aufgeschwungen, sich längs des Drahtseils bewegt und die Plattform betreten.

Für jedes Tier wurde die Zeit festgehalten, die bis zum Erreichen des Bodens oder der Plattform verging. Die geschilderte qualitative Bandbreite des Verhaltens ließ jedoch eine Auswertung dieser Zeiten als nicht sinnvoll erscheinen. Es wurde daher eine qualitative Einteilung des Verhaltens nach dem Kriterium "Betreten der Plattform" vorgenommen, da angenommen wurde, daß dieses Verhalten von allen gezeigten Verhaltensweisen den höchsten Grad an motorischer Koordination verlangt. Hierbei war auffällig, daß ein sehr hoher Prozentsatz von BALB/c-Tieren das Kriterium erreichte, während bei C57BL/6 zu jedem Testzeitpunkt maximal 40% der Tiere die Plattform innerhalb von 120 s betraten (Abb. 8). Sichtbare Veränderungen von Prozentsätzen vom ersten zum zweiten Testdurchgang sollten dagegen vorsichtig interpretiert werden, da sie auf maximal drei "abweichenden" Tieren beruhen.

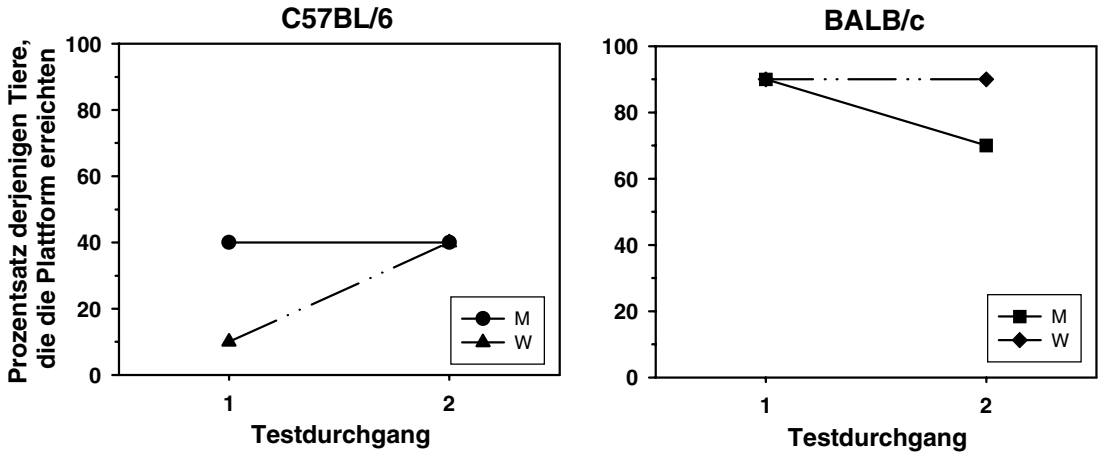

Abb. 8. Greif-Test: relative Häufigkeiten des erreichten Kriterium "Plattform vollständig betreten" (in Prozent). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c (n=40). Die Testdauer betrug maximal 120 Sekunden, die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Rotarod

Die Mittelwerte der Dauer, die die getesteten Mäuse sich auf der rotierenden Walze des Rotarod halten konnten (Abb. 9), unterschieden sich deutlich zwischen den beiden Stämmen: Während C57BL/6-Tiere ihre anfängliche Haltezeit von etwa 30 auf 60 Sekunden im dritten Testdurchgang steigerten, konnten BALB/c-Tiere nicht länger als wenige Sekunden auf der Walze verbleiben und verbesserten sich bis zur dritten Messung nur minimal. Hierbei ist anzumerken, daß auch BALB/c-Tiere bei Beginn der Rotation anfingen, Kompensationsbewegungen vorzunehmen; es hatte jedoch vielfach den Anschein, als ob sie - anders als C57BL/6 - auf der geriffelten Oberfläche keinen Halt fänden, so daß sie nahezu sofort wegrutschten. Makroskopisch sichtbare Unterschiede zwischen den Krallen beider Stämme waren nicht erkennbar.

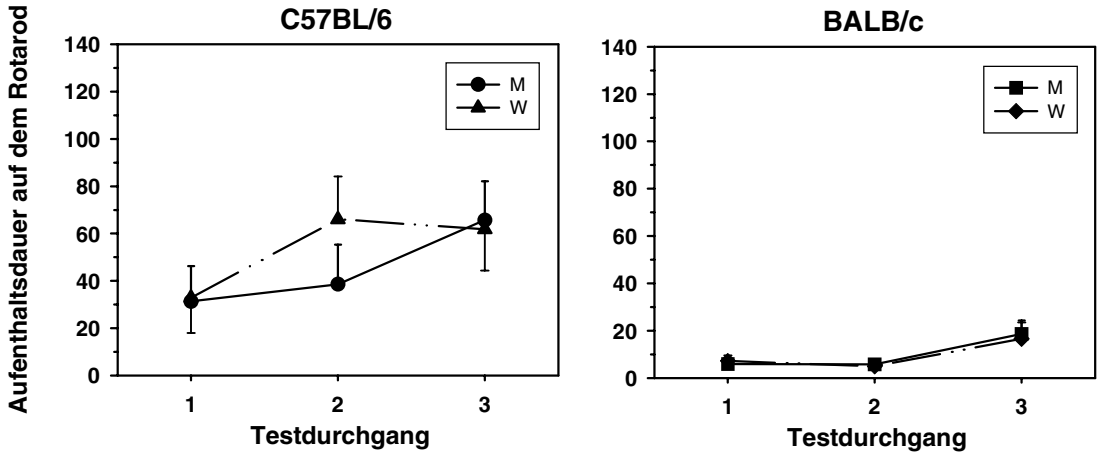

Abb. 9. Rotarod: Aufenthaltsdauer auf der rotierenden Walze (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c (n=40). Die Testdauer betrug maximal 120 Sekunden, die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Pole-Test

Der traditionelle Parameter im Pole-Test, die benötigte Zeit bis zum Verlassen der Stange[5], wies im Vergleich der beiden Stämme deutliche Unterschiede auf (Abb. 10): C57BL/6 benötigten an Tag 1 im Schnitt mehr als eine Minute, um von der Stange herunterzuklettern, und diese Zeit verringerte sich beim zweiten Testdurchgang. Weibchen schienen die Stange etwas schneller zu verlassen, was angesichts der Fehlerstreuungen jedoch nicht überbewertet werden sollte. Bei BALB/c-Tieren lagen die Mittelwerte insgesamt deutlich höher, und die Aufenthaltszeiten stiegen am zweiten Testtag gegenüber dem ersten noch an. Hier lagen die Mittelwerte beider Geschlechter dicht an der maximalen Dauer des Tests von 120 s. Diese hohen Werte reflektieren die Tatsache, daß nur 35% der BALB/c-Tiere an Tag 1 und 15% an Tag 2 überhaupt die Stange innerhalb der Beobachtungszeit verlassen haben - im Gegensatz zu 75% bei C57BL/6 an beiden Tagen. Ein typischer qualitativer Unterschied zwischen der Verhaltenssequenz von C57BL/6- und BALB/c-Tieren bestand nämlich darin, daß letztere kurz vor Erreichen des Bodens (teilweise sogar nach Vibrissenkontakt damit) erneut drehten, wieder nach oben kletterten und dort verharrten. Bei detaillierterer Auswertung der Videobänder wurde auch deutlich, daß bereits die Latenz bis zur ersten Bewegung der Tiere nach Aufsetzen auf die Stange bei BALB/c-Tieren höher lag als bei C57BL/6 (Anhang, Tabelle A-1).

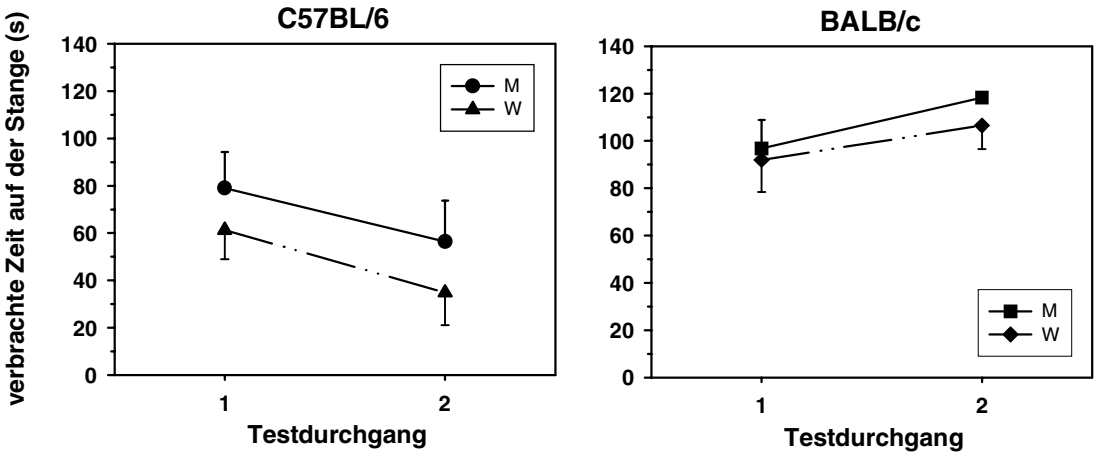

Abb. 10. Pole-Test: Auf der Stange verbrachte Zeit bis zum vollständigen Betreten des Bodens (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c (n=40). Die Testdauer betrug maximal 120 Sekunden, die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

[5] Um die Tatsache zu verdeutlichen, daß nicht alle Tiere die Stange verließen, wurden hier und in den folgenden Abschnitten statt der Bezeichnung "Latenz bis zum Erreichen des Bodens", die impliziert, daß dieses Verhalten tatsächlich gezeigt wird, die Begriffe "Aufenthaltszeit" oder "verbrachte Zeit auf der Stange" benutzt.

Elevated Plus-Maze

Im Elevated Plus-Maze verbrachten BALB/c-Tiere insgesamt mehr Zeit auf den offenen Armen als C57BL/6 (Abb. 11). Bei beiden Stämmen betraten Weibchen die offenen Arme länger als Männchen; im BALB/c-Stamm betrat am ersten Testtag sogar kein einziges Männchen einen offenen Arm. Mit Ausnahme eines drastischen Rückgangs der Aufenthaltszeiten bei wiederholter Darbietung bei C57BL/6-Weibchen unterschieden sich in den übrigen Gruppen die Werte zwischen den beiden Testtagen kaum. Generell auffällig waren die - verglichen mit anderen Verhaltensmaßen - teilweise hohen Fehlerstreuungen.

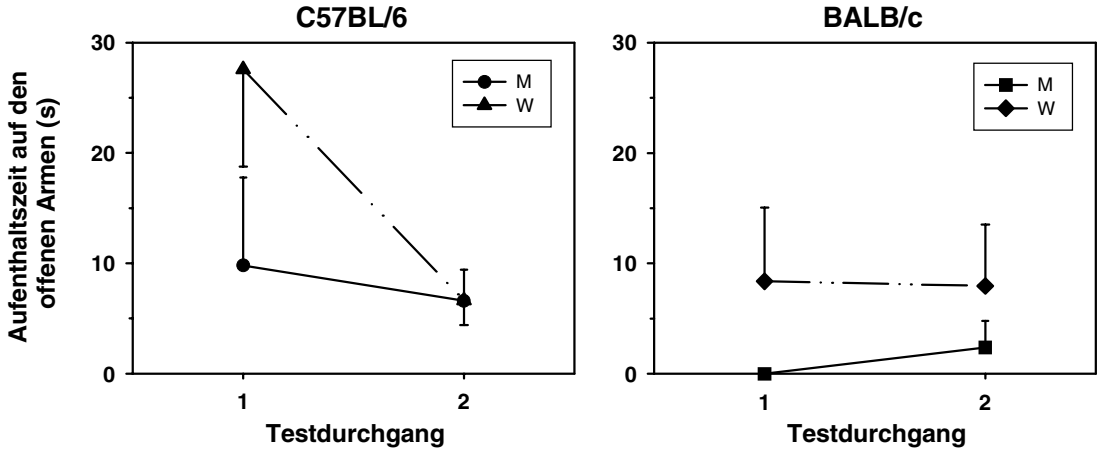

Abb. 11. Aufenthaltszeiten auf den offenen Armen des Elevated Plus-Maze (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c (n=39). Die Testdauer betrug 5 Minuten, die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

4.1.3.2 Neurochemie

Neostriatum

Abb. 12 zeigt die Konzentration mehrerer Neurotransmitter im Neostriatum. Tiere des Stammes C57BL/6 hatten höhere DA-Konzentrationen, aber niedrigere DA-Turnover-Raten (HVA/DA) als BALB/c. Keine Stammunterschiede waren bei Noradrenalin und Serotonin erkennbar. Geschlechtsunterschiede sind bei allen dargestellten Neurotransmitter praktisch vernachlässigbar.

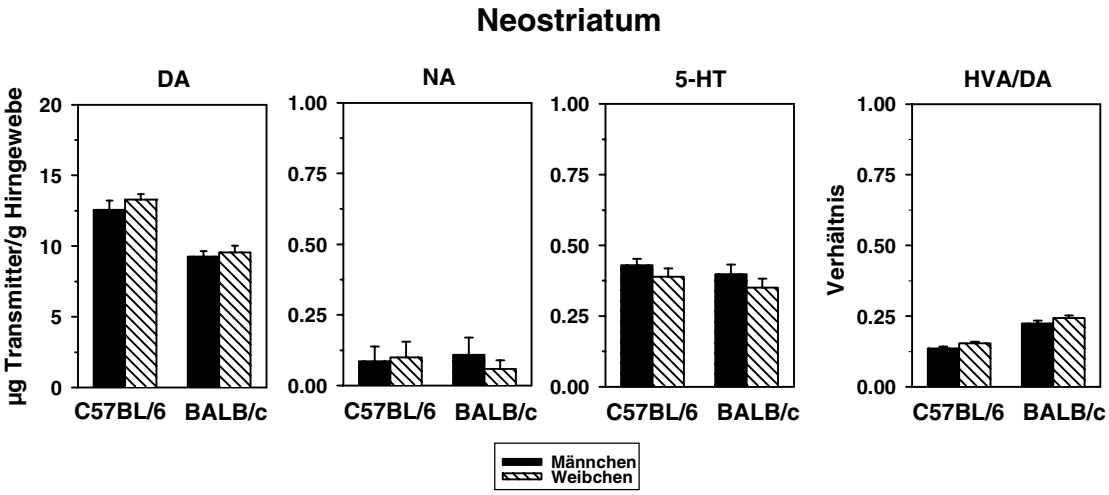

Abb. 12. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im Neostriatum. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c (n=38).

ventrales Striatum

In Abb. 13 sind die entsprechenden Werte für das ventrale Striatum wiedergegeben; hier waren nur deutliche Stammunterschiede für NA mit höheren Werten bei BALB/c zu verzeichnen.

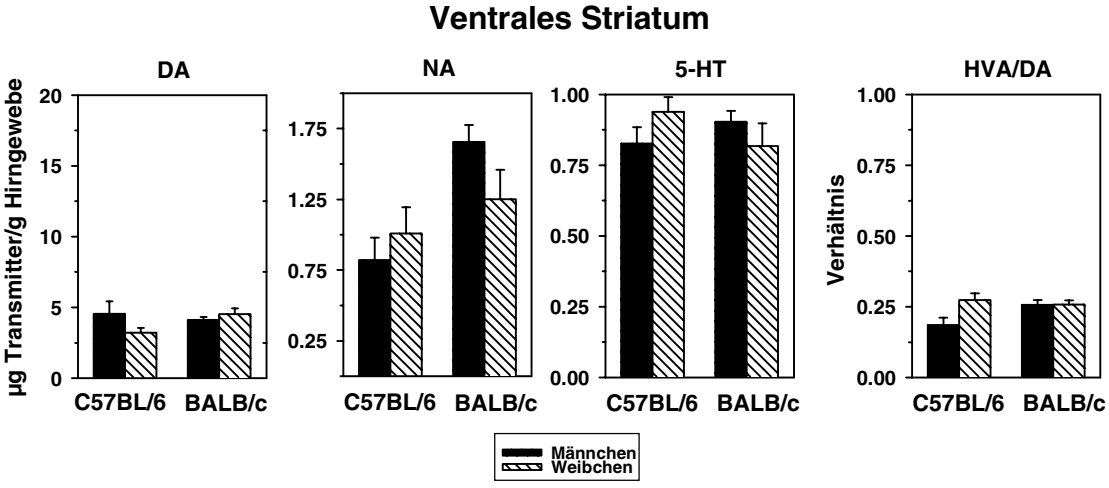

Abb. 13. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im ventralen Striatum. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c (n=39).

Im Vergleich zum Neostriatum fällt auf, daß die DA-Konzentrationen im ventralen Striatum geringer sind, die 5-HT- und NA-Spiegel dagegen höher.

4.1.3.3 Histologie

Die mittleren Anzahlen TH-positiver Zellen pro Hirnschnitt in der Substantia nigra und in der Area tegmentalis ventralis gibt Tabelle 3 wieder. In beiden Strukturen lagen die Mittelwerte der Zellzahlen bei BALB/c höher als im Stamm C57BL/6.

Tabelle 3. Mittlere Anzahlen TH-positiver Zellen in Substantia nigra (SN) und Area tegmentalis ventralis (VTA) von Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c.

	C57BL/6		BALB/c	
	Männchen (n=8)	Weibchen (n=6)	Männchen (n=9)	Weibchen (n=7)
SN	233.5± 24.2	223.1± 9.7	294.9± 9.4	265.9± 33.4
VTA	107.6± 10.2	131.8± 12.8	160.5± 19.3	137.1± 21.1

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der durchschnittlichen Zellzahlen pro Hirnschnitt. Die angegeben Werte basieren auf etwas kleineren n als die Gesamt-Stichprobengrößen, da die Immunfärbung und/oder das Schneiden einzelner Hirnschnitte suboptimal verlief. In diesen Schnitten war die Zellzählung stark erschwert oder nicht möglich; dieses Problem tritt bei Immunfärbungen gelegentlich auf [184].

4.1.4 Diskussion

Ziel dieser Vorstudie war es, basale Informationen über eine Reihe von Verhaltens- und neuralen Parametern zu gewinnen, die dahingehend ausgewählt worden waren, daß sie in nachfolgenden Untersuchungen mit dem dopaminergen Neurotoxin MPTP relevant sein könnten. Begonnen wurde damit, das Bewegungsverhalten der Tiere im Offenfeld zu beobachten. Hierbei war auffällig, daß sich die zurückgelegte Strecke zwischen BALB/c-Mäusen beider Geschlechter sowie den C57BL/6-Männchen augenscheinlich nicht wesentlich unterschied und an den drei Beobachtungsterminen auch relativ gleichbleibend war. Im Vergleich dazu zeigten Weibchen des Stamms C57BL/6 am ersten Testtermin ein um ca. 50% höheres Aktivitätsniveau, das in den folgenden Testungen zurückging. Die Defäkation, die als weiterer Parameter im Offenfeld erhoben wurde, war im BALB/c-Stamm höher (wie auch in einigen anderen Studien [128,268]); außerdem deponierten bei C57BL/6 die Weibchen scheinbar weniger Boli als die Männchen. Dieses vielschichtige Ergebnismuster geht einher mit der Tatsache, daß Offenfeldverhalten - trotz der scheinbar simplen Versuchsanordnung - mehrere über-

greifende Aspekte umfaßt (Übersicht siehe [222]): Es ist beispielsweise davon auszugehen, daß in die beobachtbare Lokomotion allgemeine Aktivität, Explorationsdrang und Emotionalität einfließen. Von den Testbedingungen hängt ab, welcher dieser Faktoren betont wird; eine mäßige Beleuchtung verschiebt den Test mehr in Richtung eines Instruments zur allgemeinen Aktivitätsmessung [222]. Diese Bedingung war bei der von uns eingesetzten moderaten Beleuchtung erfüllt. In Stammvergleichen anderer Arbeitsgruppen gab es meist eine Tendenz, daß sich Tiere vom Stamm C57BL/6 mehr fortbewegen als BALB/c ([84,87,312,348,430], gegenteilig jedoch [288]); dies zeigte sich in unseren Ergebnissen klar nur für die Weibchen. Die Literatur zu Geschlechtseffekten im Offenfeldverhalten ist hinsichtlich einer Tendenz uneinheitlich, so daß eine neuere Überblicksarbeit den Schluß zieht, daß Generalisierungen angesichts der Vielzahl von Stämmen und Untersuchungsbedingungen nicht getroffen werden sollten [286]. Ein Rückgang der Bewegungsaktivität bei Testwiederholung wird im Sinne eines Habituationslernens gedeutet, also als ein Nachlassen einer (Verhaltens-) Antwort auf einen wiederholt dargebotenen Reiz [331] und ist eine häufig gemachte Beobachtung [286]. Wie bereits erwähnt, zeichnete sich bei uns ein derartiger Lerneffekt nur in einer von vier Gruppen ab; da in anderen Untersuchungen eine Retention noch nach 5-10 Tagen feststellbar war [322,331], scheint unser 2-Tage-Intervall zwischen den Testungen für den nur schwach ausgeprägten Effekt nicht ausschlaggebend zu sein. Es kann daher nur vermutet werden, daß die laborspezifische Konstellation von Versuchsbedingungen einen Einfluß ausübte, der einer Habituation entgegenwirkte; solches ist bereits für scheinbar triviale Faktoren wie die Tageszeit der Testung nachgewiesen worden, welche mit Stamm- und anderen Faktoren hoch komplexe Wechselbeziehungen eingehen kann [322]. Die Defäkation schließlich wird typischerweise im Zusammenhang mit Emotionalität interpretiert, in dem Sinne, daß höhere Werte auf eine ausgeprägtere Ängstlichkeit hindeuten [56,222].

Im Greif-Test traten Verhaltensweisen auf, die in früheren Arbeiten mit vergleichbaren Versuchsanordungen sowohl bei Mäusen [17] als auch Ratten [441] nicht berichtet worden waren. Eine in jüngster Zeit veröffentliche Arbeit nennt aber ebenfalls eine Fülle von unterschiedlichen Verhaltensweisen [165] und bestätigt damit unsere Erfahrung, daß die Tiere meist nicht solange an einer Stelle des Drahtes hängenbleiben, wie sie diesen Kraftaufwand leisten können, sondern auf die Testsituation wesentlich aktiver reagieren. Dies stand allerdings unserem Wunsch entgegen, mit diesem Paradigma einen Parameter zu gewinnen, mittels dessen sich alle Tiere hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit gut vergleichen lassen. Die von uns vorgenommene Auswertung unter Verwendung eines 1-0-Kriteriums ermöglicht dies,

stellt auf der anderen Seite aber eine nicht unerhebliche Datenreduktion dar. Wünschenswert wäre, daß dies Kriterium von gesunden Mäusen praktisch immer erfüllt wird (in der Art eines neurologischen Tests, bei dem erst Individuen mit neurologischem Defiziten Schwierigkeiten bei der Bewältigung der Aufgabe haben sollten). Während dies auf die allermeisten BALB/c-Mäuse auch zutraf, lag der entsprechende Anteil im Stamm C57BL/6 deutlich darunter. Dies könnte die Aussagekraft des Tests (genauer: dieses Parameters) bei der geplanten Untersuchung Neurotoxin-behandelter Tiere schmälern.

Bei der Testung mit dem Rotarod wurden ebenfalls Stammunterschiede gefunden; in dieser motorischen Koordinationsaufgabe schnitten jedoch die C57BL/6-Tiere auffallend besser ab. Die sehr geringen Gruppenmittelwerte der BALB/c-Tiere - in einem anderen Stammvergleich waren deutlich bessere Leistungen gefunden worden [348] - gingen einher mit unserem Eindruck, daß diese unmittelbar nach dem Einsetzen der Rotation den geriffelten, aber sehr harten Kunststoff der Walze nicht greifen konnten und daher schnell herunterfielen. Um diese potentielle Quelle von Stammunterschieden auszuschalten, wurde beschlossen, für die nachfolgenden Untersuchungen die Walze mit einer glatten, aber griffigen Gummibeschichtung zu versehen; von dieser wurde zudem angenommen, daß sie sich auch leichter säubern und trocknen lassen würde.

Ähnlich dem Greif-Test könnte auch der Pole-Test als ein neurologischer Test klassifiziert werden. Gemäß der Darstellung der Erstautoren dieses Verfahrens wäre zu erwarten gewesen, daß unlädierte Tieren rasch die Verhaltenskette zeigen würden, die zum Betreten des Bodens (Kriterium) führt [317]. Für C57BL/6, den Stamm der Originalarbeit, traf dies in unserem Experiment auch auf die große Mehrheit der Tiere zu, und andere Autoren haben dies auch bei anderen Stämmen beobachtet [281,319]. Unseres Wissens liegen jedoch bislang keine Berichte für BALB/c vor. Wir beobachteten in diesem Stamm ein abweichendes Verhaltensmuster, bei dem sich die Tiere typischerweise drehten, nach unten bewegten, dann aber mehrheitlich wieder umkehrten und schließlich oft an einer Stelle auf der Stange verharrten. Für dieses Phänomen läßt sich keine befriedigende Erklärung geben. Ein motorisches Defizit, das die Bewältigung der Aufgabe stark erschwert haben könnte, ist nicht sehr wahrscheinlich, da die BALB/c-Tiere in der Lage waren, sich auf der Stange sowohl zu drehen als auch fortzubewegen. Eine Besonderheit unserer Versuchsanordnung betraf die Beleuchtung: Wir richteten eine helle Lampe auf die Spitze der Stange in der Annahme, dadurch die Motivation der Tiere zu erhöhen, die Stange schnell zu verlassen, da Mäuse die Tendenz zeigen, hell beleuchtete

Orte zu meiden [388]. Dies könnte die Tiere aus dem Albinostamm BALB/c allerdings irritiert oder geblendet haben. Dieser Stamm zeigte auch bei Beginn des Tests etwas längere Latenzen bis zum Einsetzen der ersten Bewegung als C57BL/6, was als Freezing-Reaktion gedeutet werden könnte. Als Konsequenz wurde beschlossen, dem einzigen uns bekannten Hinweis zu Umgebungsbedingungen im Pole-Test zu folgen und in nachfolgenden Experimenten eine schwache Beleuchtung einzusetzen [233].

Im Elevated Plus-Maze wird das Meiden der offenen Arme mit hoher, das Betreten dieser Arme dagegen mit niedrigerer Emotionalität in Verbindung gebracht. Die C57BL/6-Mäuse haben sich eher länger auf diesen Armen aufgehalten als die BALB/c-Mäuse, und allgemein schien dies auch bei Weibchen länger der Fall zu sein als bei Männchen. Andere Autoren fanden einen derartigen Geschlechtsunterschied nicht, allerdings waren dort nicht dieselben Stämme untersucht worden [346]. Der genannte Stammunterschied war insofern unerwartet, als daß im Stammvergleich anderer Autoren ein genau entgegengesetzter, sehr ausgeprägter Unterschied in der Weise gefunden wurde, daß BALB/c-Mäuse sehr lange auf den Offenarm gingen, C57BL/6-Mäuse aber nur sehr kurz [430]. Insgesamt lag das Niveau der Offenarmzeiten sehr niedrig (nur ungefähr 3% der Testdauer). Bei der Wahl der Beleuchtung in diesem Experiment war berücksichtigt worden, daß die Helligkeitsverhältnisse in diesem Test eine große Rolle spielen und entsprechende Variationen sogar differentielle Effekte in verschiedenen Stämmen hervorrufen können [243]. Deshalb war bereits eine sehr moderate Beleuchtung gewählt worden. Die sehr niedrigen Offenarmzeiten lassen dennoch den Verdacht zu, daß diese noch nicht adäquat war. Es wurde daher beschlossen, für die nachfolgenden Experimente eine minimale Rotlichtbeleuchtung zu verwenden, die an unserem Institut bereits erfolgreich bei der Testung von Mäusen eingesetzt worden war [149].

Die neurochemische *post mortem*-Analyse zur Bestimmung von Monoamin-Konzentrationen in Neostriatum und ventralem Striatum deutete auf mehrere Unterschiede hin: Der neostriatale DA-Gehalt lag im Stamm C57BL/6 höher als bei BALB/c; dies ist auch von anderen berichtet worden [387,396], jedoch auch das Gegenteil [200] oder relative Gleichheit der DA-Konzentrationen in beiden Stämmen [379]. Bedenkt man, daß derartige Divergenzen in den Befunden auch bei anderen Stammvergleichen aufgetreten sind (vgl. [356,411]), wird erkennbar, daß offenkundig andere als nur genetische Einflüsse beträchtliche Auswirkungen auf gemessene Transmitterkonzentrationen ausüben. Dies unterstreicht die Bedeutung der Gewinnung laborspezifischer Erfahrungswerte. Dem geringeren DA-Gehalt bei BALB/c steht ande-

rerseits ein etwas höherer DA-Umsatz als bei C57BL/6 entgegen. Im ventralen Striatum waren keine klaren Stammunterschiede bezüglich Dopamin, wohl aber für das Katecholamin Noradrenalin zu beobachten. Erwähnt, aber ebenfalls nicht weiter vertieft werden soll schließlich die interessante Tatsache, daß sich die beiden benachbarten Hirnstrukturen stammübergreifend durch charakteristische Transmitter-"Profile" voneinander unterschieden. Hinsichtlich der Methodik läßt sich feststellen, daß die Prozeduren der Gewebeaufbereitung und der HPLC-Analyse, wie sie im Institut jahrelang auf Hirngewebe der Ratte angewendet worden waren [368,369,424], offenbar auch bei Mäusen hervorragend zur neurochemischen Analytik geeignet sind.

Bei der Zählung der Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen in den Strukturen der Substantia nigra und der Area ventralis tegmentalis lagen die mittleren Anzahlen pro Hirnschnitt bei BALB/c jeweils numerisch etwas höher als bei C57BL/6, was auf eine höhere Zahl DAerger Neuronen bei BALB/c hindeutet (TH wird als guter Marker für dopaminerge Neuronen betrachtet [211]). Dies steht in Übereinstimmung mit einigen anderen Stammvergleichen, in denen C57BL/6 ebenfalls der Stamm mit der geringeren Zahlen dopaminerger Neuronen war [166,307]. Interessant ist der Kontrast zwischen den höheren Zellzahlen in der Substantia nigra von BALB/c und deren niedrigeren DA-Konzentrationen im Striatum, während es sich bei C57BL/6 umgekehrt verhält. Solche auf den ersten Blick paradoxen Konstellationen sind jedoch schon früher beobachtet worden [411] und zeigen, daß gemessene DA-Konzentrationen in einer Hirnregion nicht notwendigerweise die Anzahl der sie innervierenden DAergen Neuronen widerspiegeln.

Die Voruntersuchung an intakten, unbehandelten C57BL/6- und BALB/c-Mäusen hat eine Fülle von Informationen über Gemeinsamkeiten und Unterschiede dieser Stämme geliefert. Für einige dieser Unterschiede gab es vergleichbare Befunde aus der Literatur, einige andere wichen davon ab bzw. waren bisher nicht dokumentiert; daneben deuteten sich in einigen Verhaltensmaßen auch Geschlechtsunterschiede an. Während die Messung neuraler Parameter bereits zufriedenstellend war, legten die Ergebnisse mancher Verhaltensmeßmethoden noch Änderungen nahe. Diese Informationen wurden verwertet, um die nächste Etappe unseres Projektes, einen Stammvergleich hinsichtlich MPTP-Suszeptibilität, möglichst effektiv durchführen zu können. Die Ergebnisse dazu werden im nachfolgenden Abschnitt dargestellt.

4.2 Parentalgeneration

4.2.1 Einleitung

Die Untersuchung von Parentalstämmen stellt den einleitenden Schritt bei einer QTL-Analyse dar und dient dazu sicherzustellen, daß die vorausgesetzten phänotypischen Unterschiede zwischen diesen Stämmen auch tatsächlich vorhanden sind. Wir haben anhand von Literaturangaben die Stämme C57BL/6 und BALB/c ausgewählt, bei denen gezeigt worden war, daß eine MPTP-Behandlung im erstgenannten Stamm stärkere neurotoxische Effekte ausübt als im zweitgenannten [200,396]. Weiter war für die Stammauswahl ausschlaggebend, daß es sich um weitverbreitete und gut charakterisierte Inzuchtstämme handelte, die sich unproblematisch züchten und kreuzen lassen, für die genügend Mikrosatellitenmarker zwecks späterer Genotypierung der F2-Generation zur Verfügung stehen [321] und zwischen denen eine ausreichende Polymorphismusrate der Marker vorliegt (d.h. daß die Stämme sich durch Marker unterscheiden lassen) [39]. Für die Phänotypisierung wurden diejenigen Methoden benutzt, mit denen wir im Vorversuch Erfahrung gesammelt hatten. An den Verhaltenstestverfahren Plus-Maze und Rotarod haben wir Modifikationen vorgenommen in der Erwartung, daß diese die Aussagekraft der Tests hinsichtlich eines Stammvergleichs der MPTP-Wirkungen erhöhen würden. Die Entscheidung, auch das Nestbauverhalten zu untersuchen, ergab sich aus ersten Bebachtungen MPTP-behandelter Mäuse, die im Gegensatz zu Kontrolltieren auffallend weniger Manipulationen an der Käfigeinstreu vornahmen. Eine entscheidende Frage war, inwieweit die einzelnen Verfahren die neurotoxischen Effekte von MPTP erfassen können.

Die Wahl des einwöchigen Zeitplans (von Behandlung bis Hirnentnahme) und die Wahl des Dosierungsschemas (4 Injektionen im 2-Stunden-Abstand) erfolgten anhand der Tatsache, daß beides im MPTP-Mausmodell sehr verbreitete Größen sind. Auch die bei den ersten von uns untersuchten Tieren benutzte MPTP-Dosis MPTP4x20 war anhand früherer Literaturberichte ausgewählt worden. Die Tatsache, daß diese Dosis zu kompletter Letalität bei den Weibchen beider Stämme führte, machte jedoch die Wahl einer besser geeigneten MPTP-Dosis erforderlich. Zu diesem Zweck wurden zunächst mehrere Dosierungen und Dosierungsschemata ausprobiert und hinsichtlich ihrer neurotoxischen und letalen Effekte bewertet, bis die Entscheidung für eine brauchbare Dosis (MPTP4x15) getroffen wurde.

4.2.2 Durchführung

Versuchstiere waren Männchen und Weibchen der Maus-Inzuchtstämme C57BL/6JIbm (n=64) und BALB/cIbm (n=64). Etwa die Hälfte der Tiere beider Kreuzungen und Geschlech-

ter wurde mit MPTP behandelt, die andere Hälfte nur mit physiologischer Kochsalzlösung (KSL). Zu Beginn des Experiments wurde kleinen Stichproben von Tieren jeweils eine der folgenden MPTP-Dosierungen verabreicht:

- 4 Injektionen von jeweils 20 mg MPTP-HCl/kg Körpergewicht im Abstand von 2 Stunden (MPTP4x20)
- 4 Injektionen von jeweils 10 mg MPTP-HCl/kg Körpergewicht im Abstand von 2 Stunden (MPTP4x10)
- 2 Injektionen von jeweils 20 mg MPTP-HCl/kg Körpergewicht im Abstand von 2 Stunden jeweils an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (MPTP2x20x2)

Keines der aufgeführten Schemata erschien hinsichtlich seines Wirkungsprofils (neurotoxische Effekte vs. Letalität) geeignet. Deshalb wurde als weitere Dosierung MPTP4x15 (d.h. 4 Injektionen von jeweils 15 mg MPTP-HCl/kg Körpergewicht im 2-Stunden-Abstand) getestet. Aufgrund deren günstigen Wirkungsprofils wurden dann alle weiteren MPTP-behandelten Tiere der Parentalgeneration nach diesem Schema behandelt. Versuchsablauf und Versuchsbedingungen entsprachen bei diesen Tieren in allen Aspekten dem Ablaufschema in Abb. 5 und den Material- und Methodenbeschreibungen in Kapitel 3.

4.2.3 Ergebnisse

4.2.3.1 Dosierungen MPTP4x20, MPTP2x20x2 und MPTP4x10

Tabelle 4 zeigt die Letalität und DA-Depletion im Neostriatum nach verschiedenen MPTP-Dosierungen. Die Dosis MPTP4x20 erzeugte den stärksten striatalen Dopaminverlust von allen untersuchten Gruppen: Betrachtet man die C57-Männchen, betrug die DA-Konzentration dort nur etwa 5% des Kontrollniveaus, in den BALB/c-Männchen dagegen noch 75%. Jedoch war bei dieser Dosis eine komplette Letalität bei den Weibchen beider Stämme zu verzeichnen; typischerweise starben die Tiere nach der dritten oder vierten Injektion. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Dosierungen ausprobiert: Mit der Dosierung MPTP2x20x2 wurde das Intervall zwischen zweiter und dritter Injektion von zwei Stunden auf einen Tag ausgeweitet, mit der Dosierung MPTP4x10 dagegen die verabreichte Menge des Neurotoxins halbiert. Beide Injektionspläne verhinderten die Letalität bei den Weibchen vollständig.

Tabelle 4. MPTP-bedingte Letalität und neostriatale Dopamin-Depletion in Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die eine Behandlung mit einer von drei verschiedenen MPTP-Dosierungen erhalten hatten.

	C57BL/6						BALB/c					
	Männchen			Weibchen			Männchen			Weibchen		
	MPTP 4x20	MPTP 2x20x2	MPTP 4x10	MPTP 4x20	MPTP 2x20x2	MPTP 4x10	MPTP 4x20	MPTP 2x20x2	MPTP 4x10	MPTP 4x20	MPTP 2x20x2	MPTP 4x10
Anzahl gestorbener Tiere/ Gesamtzahl Tiere	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2
neostriatale DA-Depletion (Mittelwert)	94.4%	75.6%	69.8%	./.	75.6%	82.9%	24.3%	56.6%	28.8%	./.	74.3%	32.9%

./.= aufgrund der vollständigen Letalität liegen keine neurochemischen Daten vor.

Während die Dosis MPTP4x10 in den meisten Fällen eher niedrige Depletionen hervorrief und auch nur zu geringen Verhaltensdefiziten führte (siehe dazu Abb. 17), lagen die Depletionen bei MPTP2x20x2 in der Regel höher; diese Dosierung bot sich jedoch aus versuchsökonomischer Sicht nicht an, weil die Tiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt werden müssen und sich die Versuchsdauer dadurch verlängert. Deshalb wurde die Effektivität der Dosierung MPTP4x15 überprüft. Diese erwies sich als günstig hinsichtlich Letalität und Neurotoxizität, so daß die endgültige Wahl auf diese Dosierung fiel. Die Ergebnisse hierzu sind im folgenden Abschnitt ausführlich dargestellt.

4.2.3.2 Dosierung MPTP4x15

4.2.3.2.1 Verhalten

Nach Behandlung mit MPTP beobachteten wir - teilweise schon Minuten nach der ersten Injektion - eine Vielzahl der akuten Phänomene, die in Abschnitt 1.4.4 referiert worden waren, insbesondere buckelige Körperhaltung, Tremor, rigide Extremitäten, Speichel- und Tränenfluß, Straub-Schwanz und schleppender/torkelnder Gang. Darüber hinaus wirkten die Tiere bereits in ihren Heimkäfigen akinetisch, d.h. sie bewegten sich äußerst selten und langsam. Verhaltensweisen wie Nahrungsaufnahme, Putzen des Körpers oder Klettern am Käfiggitter, welche für gesunde bzw. mit Kochsalzlösung behandelte Tiere typisch sind, sahen wir bei den MPTP-Tieren am Tag 1 nur äußerst selten.

Offenfeld

Abb. 14 gibt die Lokomotion der Tiere als zurückgelegte Strecke im Testzeitraum von 10 Minuten wieder. Das Niveau der C57BL/6-Kontrolltiere lag etwas höher als das bei BALB/c. Die männlichen C57BL/6-Kontrollen zeigten auch einen leichten Abfall der Lokomotion von Tag 1 nach Tag 2; ansonsten lassen die Verlaufskurven der Kontrollen über vier Tage keine klare Habituation erkennen. Sehr auffällig ist ein massiver Rückgang der Fortbewegungsaktivität von MPTP-behandelten Tieren beider Stämme am Tag der Behandlung; bei BALB/c liegen die Werte am folgenden Tag wieder auf Kontrollniveau, wogegen dies bei MPTP-behandelten C57BL/6-Mäusen erst an Tag 3-4 eintritt.

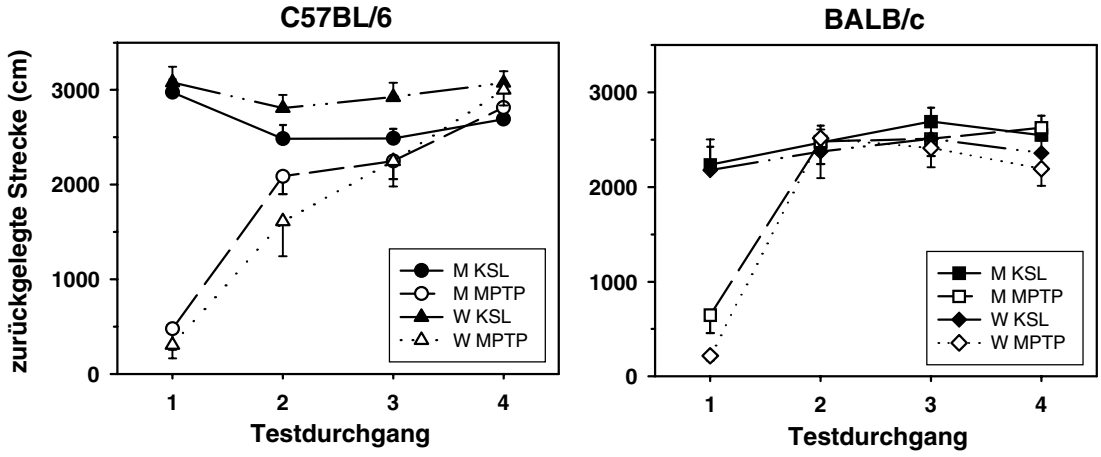

Abb. 14. Zurückgelegte Strecke im Offenfeld (in cm; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Maustämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=95). Die Testdauer betrug 10 Minuten; die erste Messung erfolgte 1 Stunde nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Zwecks Datenreduktion wurde der lineare Trend der Verlaufskurven aus Abb. 14 ermittelt; diese Werte sind in Tab. 5 aufgeführt und spiegeln die Steigung der Graphen wider. Die linearen Trendkoeffizienten wurden einer dreifaktoriellen ANOVA mit den Faktoren "Stamm", "Geschlecht" und "Behandlung" unterzogen. Als signifikant erwiesen sich dabei die Haupteffekte "Stamm" ($F_{1,87}$=8.21, p=0.0052) und "Behandlung" ($F_{1,87}$=28.19, p<0.0001) sowie die Wechselwirkung "Stamm" x "Behandlung" ($F_{1,87}$=8.85, p=0.0038). Bei einer *post hoc*-Analyse zeigte sich, daß sich die Koeffizienten zwischen den beiden Stämmen in der MPTP-Bedingung signifikant im Sinne höherer Werte bei C57BL/6 unterscheiden (p=0.0005), nicht aber in der Kontrollbedingung (p=0.9999).

Tabelle 5. Linearer Trend (Mittelwerte und Standardfehler) der zurückgelegten Strecke im Offenfeld bei Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	C57BL/6				BALB/c			
	Männchen		Weibchen		Männchen		Weibchen	
	KSL (n=12)	MPTP (n=13)	KSL (n=12)	MPTP (n=11)	KSL (n=12)	MPTP (n=13)	KSL (n=11)	MPTP (n=11)
$a_{1(\text{zurückgelegte Strecke})}$	13.0 ±53.7	395.5 ±62.0	64.4 ±56.1	611.2 ±85.7	69.8 ±81.8	230.0 ±100.6	20.0 ±45.5	121.5 ±119.7

Neben horizontaler Bewegung (=Lokomotion) wurde auch die Dauer der vertikalen Aufrichtungen der Tiere gemessen (Abb. 15). Ähnlich wie bei der Lokomotion, trat auch hier in den MPTP-Gruppen ein massiver Rückgang der Aufrichtungsdauer auf, bei C57BL/6 sank diese sogar nahezu auf Null.

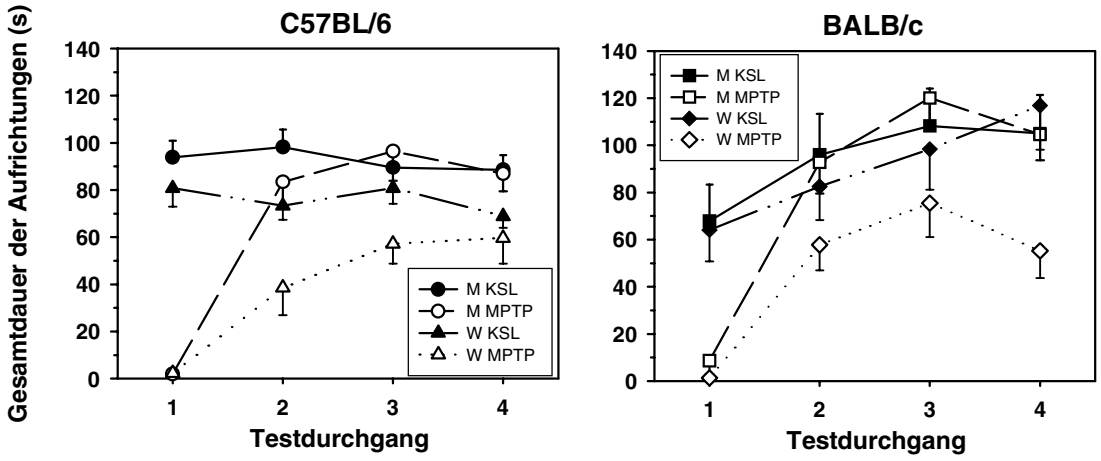

Abb. 15. Gesamtdauer der Aufrichtungen im Offenfeld (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=95). Die Testdauer betrug 10 Minuten; die erste Messung erfolgte 1 Stunde nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Der Anstieg an den folgenden Tagen unterscheidet sich von dem der Lokomotion aber darin, daß besonders die BALB/c-Weibchen das Kontrollniveau im Beobachtungszeitraum nicht ganz erreichen.

Hinsichtlich der Defäkation ist auffällig, daß diese mit wiederholter Testdarbietung in allen Gruppen anstieg (Abb. 16). MPTP-behandelte Tiere wiesen am Tag der Behandlung praktisch keine Defäkation auf; an den folgenden Tagen stieg die Zahl der deponierten Boli aber auf das Niveau der Kontrolltiere an. Generell scheint die Defäkation im Stamm BALB/c höher zu liegen als bei C57BL/6.

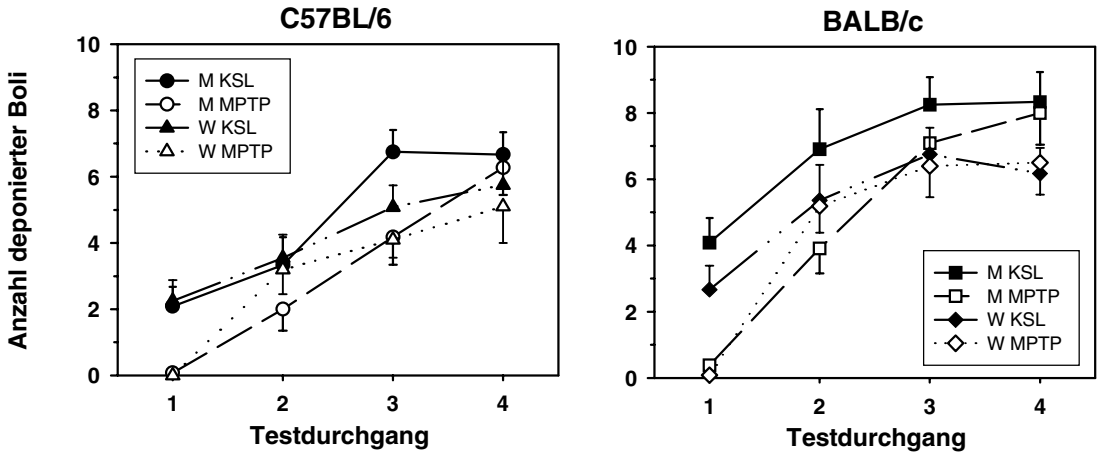

Abb. 16. Anzahl der Fäkalboli, die im Offenfeld deponiert wurden (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=90). Die Testdauer betrug 10 Minuten; die erste Messung erfolgte 1 Stunde nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Abb. 17 zeigt die Lokomotion im Offenfeld bei C57BL/6-Männchen in Abhängigkeit von MPTP-Behandlungen mit verschieden hohen Dosierungen; diese Daten entstammen teilweise den bereits in Abschnitt 4.2.3.1 beschriebenen Stichproben. Alle MPTP-Dosen führten zu einer drastischen Abnahme der zurückgelegten Strecke. An den folgenden Tagen fand in allen diesen Gruppen eine Annäherung an das Niveau kontrollbehandelter Tiere statt, wobei dieser Anstieg dosisabhängig verlief: Nach der Dosis MPTP4x10 ereichte die Lokomotion bereits bei der zweiten Testung wieder Kontrollniveau, bei MPTP4x15 geschah dies an Tag 3, bei MPTP4x20 nicht einmal vollständig an Tag 4. Dies kann vorsichtig als Hinweis darauf angesehen werden, daß die Dauer von Verhaltensdefiziten der horizontalen Aktivität nach MPTP-Gabe dosisabhängig sein könnte; zu berücksichtigen ist dabei, daß eine solche Vermutung nur auf sehr kleine Fallzahlen bei den Dosierungen MPTP4x10 und MPTP4x20 gestützt ist.

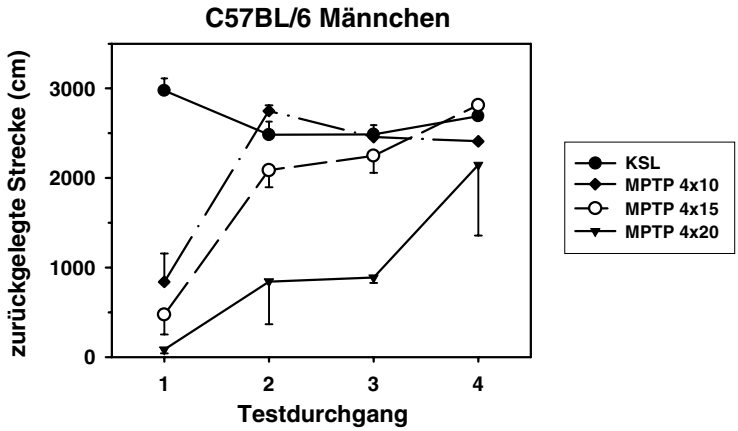

Abb. 17. Zurückgelegte Strecke im Offenfeld von männlichen C57BL/6-Mäusen, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder einer von drei verschiedenen MPTP-Dosierungen erhalten hatten (in cm; Mittelwerte und Standardfehler). Zusätzlich zu den Daten männlicher C57BL/6-Tiere aus Abb. 14 wurden auch die Daten aus den Versuchsgruppen mit den Dosierungen MPTP4x20 (n=2) und MPTP4x10 (n=2) aus den Dosisfindungsexperimenten aufgetragen. Die Testdauer betrug 10 Minuten; die erste Messung erfolgte 1 Stunde nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Nestbau

Die Auswertung des Nestbaus erfolgt mittels Kontingenztafeltests. Während die Daten beider Geschlechter in Tabelle 6 getrennt aufgelistet sind, wurden sie für die statistische Auswertung gepoolt, da augenscheinlich keine strukturellen Unterschiede zwischen den Geschlechtern vorlagen und die Anzahl der zu vergleichenden Gruppen auf diese Weise überschaubar gehalten werden konnte. Beim Vergleich von Kontroll- und Experimentalgruppen - getrennt nach Stamm - mittels Kontingenztafeltest betrugen die p-Werte für C57BL/6 $p<0.0001$ und für BALB/c $p=0.0435$, was einen Anstieg der Nestbaulatenz in beiden Stämmen andeutet. Für den Vergleich zwischen den MPTP-behandelten Gruppen beider Stämme ergibt sich $p<0.0001$; dieser Wert deutet auf höhere Latenzen bei C57BL/6 hin. Obwohl sich beim Vergleich der Kontrollgruppen bei zweiseitiger Fragestellung nur ein p-Wert von $p=0.1060$ einstellt, ist doch bei Betrachtung der Daten erkennbar, daß im Gegensatz zu BALB/c bei den C57BL/6 in der Kontrollbedingung zwar der überwiegende Teil, aber noch nicht alle der Tiere bereits einen Tag nach der Behandlung mit dem Nestbau begonnen hatten, so daß die Unterschiede zwischen den MPTP-Gruppen nicht zweifelsfrei interpretiert werden können. Deshalb wurde zusätzlich mit dem Patel-Hoel-Test ein non-parametrischer Test für Interaktion

gerechnet [236]. Es handelt sich um einen explizit gerichteten Test, daher wird der p-Wert für *ein*seitige Fragestellung ausgewiesen und beträgt p=0.0026; dies Ergebnis kann als deutlicher Hinweis darauf interpretiert werden, daß die MPTP-Behandlung gegenüber den Kontrollen bei C57BL/6 einen stärkeren Effekt auf den Nestbau hatte als bei BALB/c.

Tabelle 6. Nestbauverhalten von Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	C57BL/6				**BALB/c**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
Nestbaubeginn	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=13)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=11)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=13)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=12)**
nach 1 Tag	80%	38%	80%	18%	100%	69%	100%	83%
nach 2 Tagen	0%	8%	10%	0%	0%	23%	0%	17%
nach 3 Tagen	20%	38%	10%	55%	0%	8%	0%	0%
nach 4 Tagen	0%	8%	0%	18%	0%	0%	0%	0%
nach 5 Tagen	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
nach 6 Tagen	0%	0%	0%	9%	0%	0%	0%	0%
nach 7 Tagen	0%	8%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Angegeben sind relative Häufigkeiten des Nestbaubeginns in Prozent der jeweiligen Gruppengröße. Die Zeitangaben sind bezogen auf den Tag der Behandlung.

Greif-Test

Im Greif-Test (Abb. 18) wurde zusätzlich zu den schon in Abschnitt 4.1.3.1 beschriebenen, qualitativ voneinander differierenden Verhaltensweisen auch beobachtet, daß einige MPTP-behandelte Tiere während der gesamten Beobachtungszeit mit den Vorderpfoten gleichsam starr am Drahtseil hängengeblieben sind, so daß das Grundproblem der Bewertung von Zeitmaßen für diese unterschiedlichen Verhaltensweisen bestehen blieb. Die Daten wurden deshalb wiederum überführt in Prozentwerte von Tieren pro Gruppe, die die Plattform betreten haben, und werden hier nur deskriptiv behandelt. Anders als im Vorversuch bestand im vorliegenden Experiment kein großer Niveauunterschied zwischen den Kontrollgruppen beider Stämme. Dieses Kontrollniveau blieb bei beiden BALB/c-Geschlechtern über die vier Tage hinweg relativ stabil, während es bei C57BL/6 an den beiden letzten Testtagen zu gewissen Niveauverschiebungen kam. Ein klarer Effekt scheint darin zu liegen, daß in allen MPTP-Gruppen am ersten Tag deutlich weniger Tiere die Plattform erreichten als in den jeweiligen

Kontrollgruppen. An den darauffolgenden Testterminen kam es zu einer Annäherung auf Normalniveau, wobei es den Anschein hat, als ob bei BALB/c dieser Leistungsanstieg etwas steiler erfolgte als bei C57BL/6, so daß von einer gewissen Ähnlichkeit des Datenmusters im Vergleich zur Lokomotion im Offenfeld gesprochen werden kann. Als ein Problem in der praktischen Durchführung kristallisierte sich heraus, daß die Tiere sich beim Anhängen an den Draht verschiedenartig verhielten (beispielsweise wollten manche Tiere nicht sofort greifen, andere wiederum zogen sich bereits vor dem "Hängenlassen" kraftvoll an den Draht heran), eine Tatsache, die die Durchführungsobjektivität des Testverfahrens milderte. Mehrere Versuche, diese Fehlerquelle zu beseitigen (z.B. durch Herantransport der Tiere an den Draht mittels einer Unterlage), erwiesen sich als nicht praktikabel.

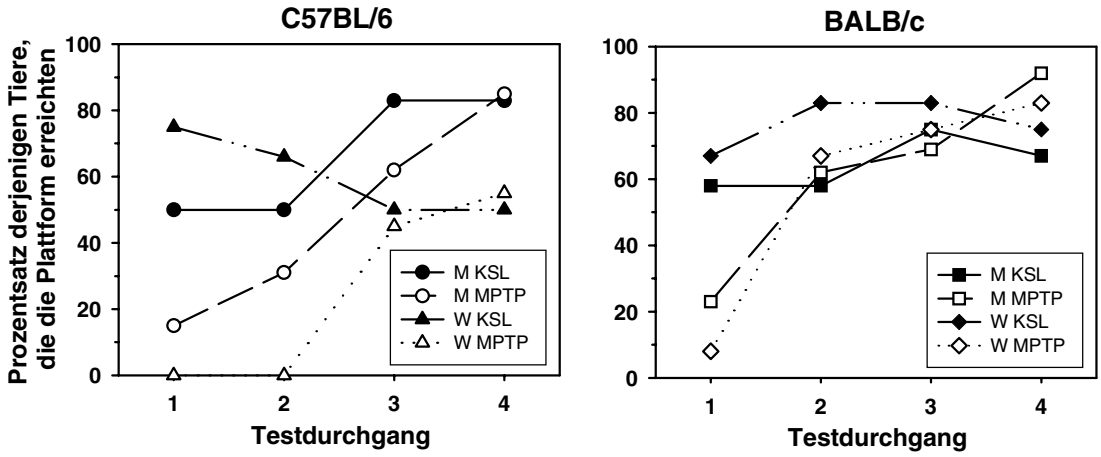

Abb. 18. Greif-Test: relative Häufigkeiten des Kriterium "Plattform vollständig betreten". Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=97). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 2 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Rotarod

C57BL/6-Mäuse verweilten generell länger auf der drehenden Walze des Rotarod, und die Kurvenverläufe aller Gruppen über die vier Testzeitpunkte hinweg deuten einen stärkeren Leistungsanstieg an als bei den BALB/c-Mäusen (Abb. 19). Leistungsunterschiede zwischen den Geschlechtern waren sehr gering. Die Leistung nach MPTP scheint bei C57BL/6 nur andeutungsweise niedriger zu liegen als nach der Kontrollbehandlung mit KSL (siehe vor allem Tag 3), und im Stamm BALB/c lagen praktisch keine Unterschiede zwischen MPTP- und KSL-Gruppen vor.

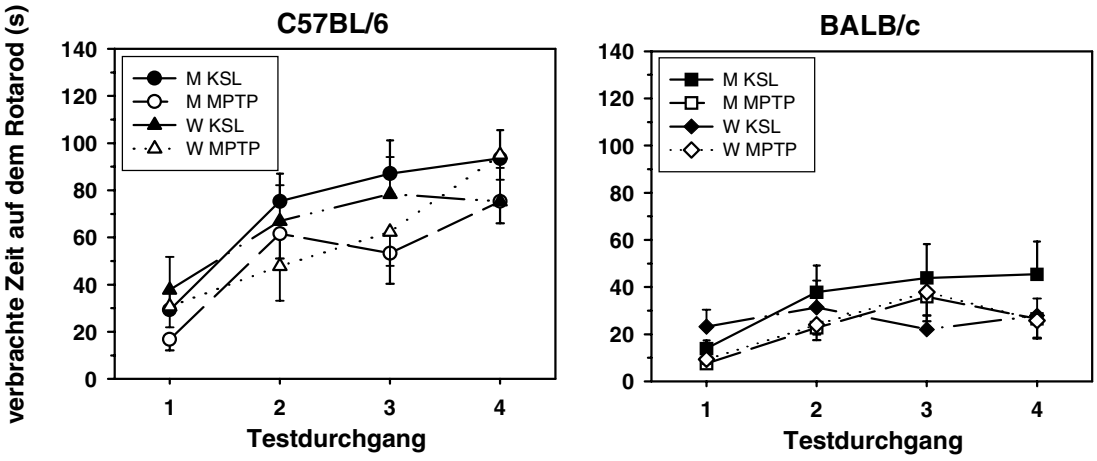

Abb. 19. Rotarod: Verbrachte Zeit auf der rotierenden Walze (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=89). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 2.5 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Pole-Test

Im Pole-Test (Abb. 20) traten deutliche Verhaltensunterschiede zwischen den beiden untersuchten Stämmen auf: C57BL/6-Kontrolltiere verließen die Stange bei der ersten Testung im Mittel nach 40 Sekunden, an den folgenden Tagen sogar noch etwas schneller. In den MPTP-behandelten Gruppen waren die Zeiten an den Tagen 1 und 2 deutlich erhöht und lagen erst ab Tag 3 im Bereich der Kontrollwerte. Geschlechtsunterschiede waren vernachlässigbar. Bei den BALB/c-Kontrolltieren lagen die mittleren Aufenthaltszeiten wesentlich höher als bei C57BL/6, und bei den Männchen ist sogar noch ein Anstieg der Zeiten mit wiederholter Testdarbietung zu erkennen. Die Zeiten der BALB/c-MPTP-Gruppen lagen am Tag der Behandlung (Testdurchgang 1) etwa so hoch wie in den Kontrollgruppen, an den folgenden Tagen jedoch niedriger als bei diesen. Ein deutlicher Gegensatz zwischen den beiden Stämmen lag darin, daß bei C57BL/6 fast alle Kontrollen die Stange innerhalb der Testspanne verließen und dies in der MPTP-Gruppe auch für die Tage 3 und 4 gilt, während bei BALB/c vor allem in den Kontrollgruppen teilweise nur ein Bruchteil aller getesteten Tiere den Boden betreten hat (Anhang, Tabelle A-2). Wie schon im Vorversuch, drehten BALB/c-Tiere oft kurz vor dem Boden um und wirkten insgesamt motorisch unruhig. Eine zusätzliche Auswertung anhand der Videobänder ergab tatsächlich, daß BALB/c-Mäuse sich im Schnitt mehrere Male auf der Stange drehten (Anhang, Tabelle A-3).

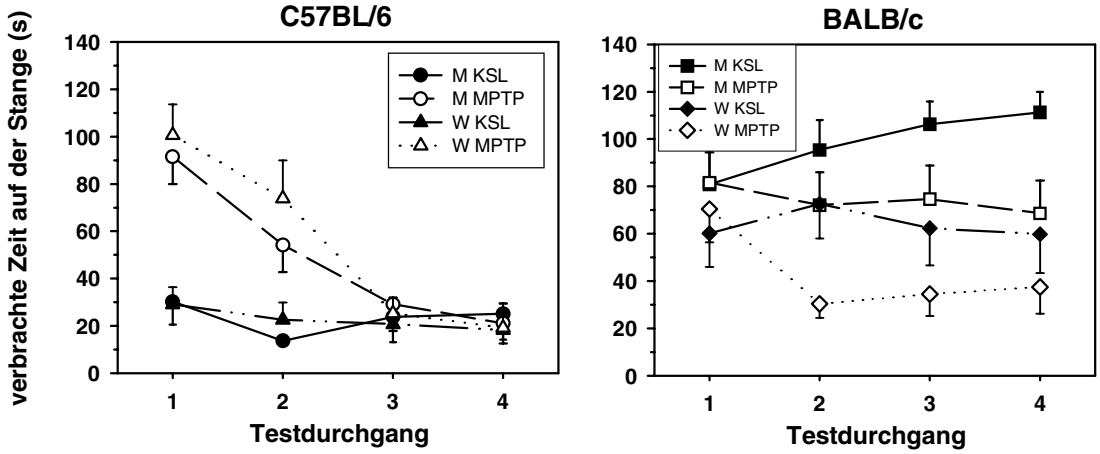

Abb. 20. Pole-Test: Auf der Stange verbrachte Zeit bis zum vollständigen Betreten des Bodens (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=89). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 3 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Elevated Plus-Maze

Bei den Offenarmzeiten im Plus-Maze (Abb. 21) war als allgemeine Tendenz sichtbar, daß die Mittelwerte bei Testung 1 höher lagen als bei Testung 2.

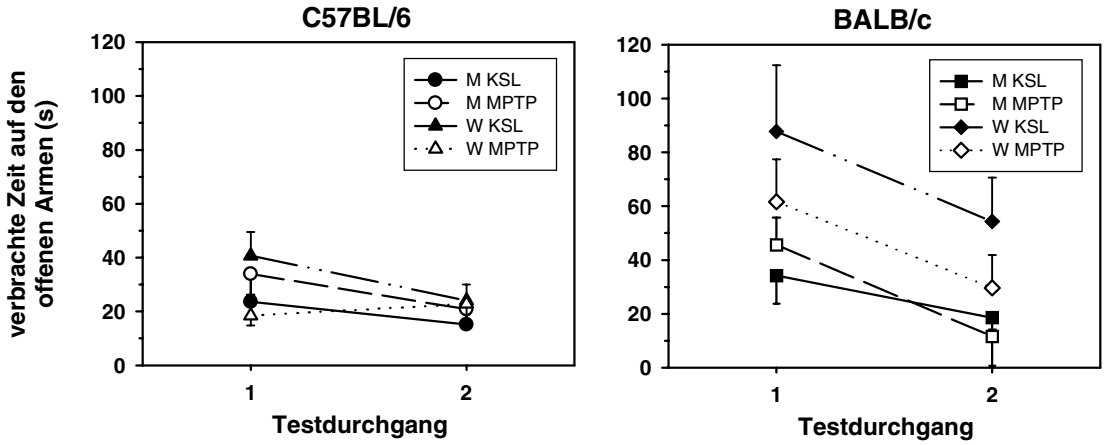

Abb. 21. Aufenthaltszeiten auf den offenen Armen des Elevated Plus-Maze (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=89). Die Testdauer betrug 5 Minuten. Die erste Testung erfolgte 2 Tage nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Während sich im Stammvergleich das Niveau von C57BL/6-Tieren beider Geschlechter wenig von dem der BALB/c-Männchen unterschied, fielen BALB/c-Weibchen durch deutlich längere Aufenthaltszeiten auf den offenen Armen auf. Ein eindeutiger Unterschied zwischen Kontroll- und MPTP-Bedingung zeichnete sich nicht ab.

4.2.3.2.2 Neurochemie

Neostriatum (Abb. 22)

Eine ANOVA für den Dopamingehalt im Neostriatum mit den Faktoren Behandlung, Stamm und Geschlecht ergab einen signifikanten Behandlungseffekt ($F_{1,89}$=617.69, p<0.0001) im Sinne niedrigerer Konzentrationen nach MPTP- als nach Kontrollbehandlung (KSL). Die Interaktion "Stamm" x "Behandlung" wurde ebenfalls signifikant ($F_{1,89}$=48.70, p<0.0001). Eine *post hoc*-Testung erbrachte signifikante Unterschiede sowohl zwischen den KSL- als auch zwischen den MPTP-Gruppen beider Stämme (in beiden Fällen p=0.0002):

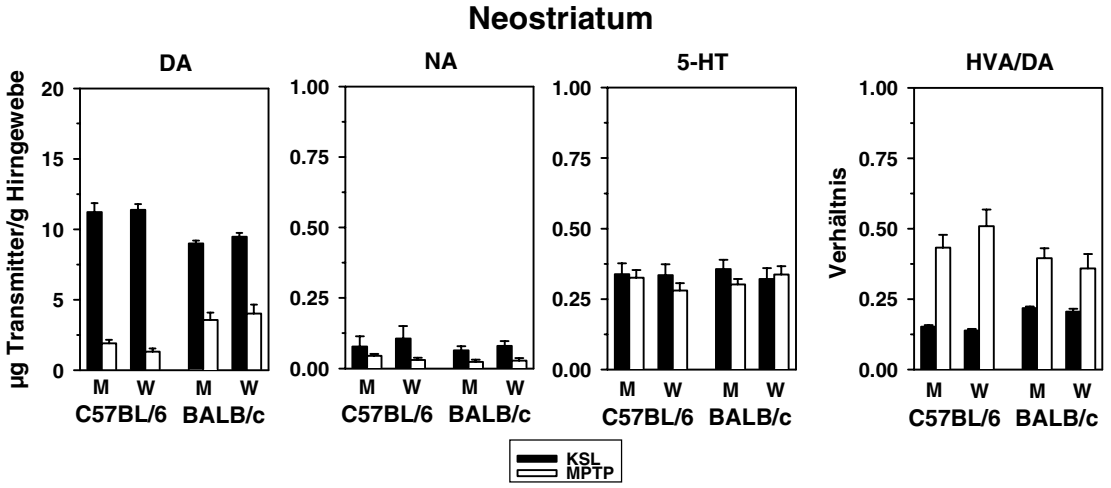

Abb. 22. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im Neostriatum. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP4x15 (weiße Balken) erhalten hatten (n=97).

Diese Ergebnisse zeigten an, daß die C57BL/6-Kontrollen höhere DA-Spiegel hatten als die BALB/c-Kontrollen, daß sich dieser Unterschied aber in der MPTP-Bedingung ins Gegenteil verkehrte. Die zugehörigen DA-Depletionen, also der Verlust in Prozent des Mittelwertes der

jeweiligen Kontrolltiere, betrugen etwa 85% für C57BL/6 und 59% für BALB/c. Für das Verhältnis HVA/DA erreichte der Haupteffekt "Behandlung" einen p-Wert unter 0.0001 ($F_{1,89}$=100.00) und die Interaktion "Stamm" x Behandlung einen p-Wert von 0.0016 ($F_{1,89}$=10.66); bei einer *post hoc*-Analyse erbrachte der Vergleich der Kontrollgruppen von C57BL/6 vs. BALB/c p=0.2308 und der MPTP-Gruppen p=0.0002; letzteres deutete auf einen höheren Mittelwert bei C57BL/6. Eine ANOVA für den Transmitter NA ergab für den Faktor "Behandlung" einen p-Wert von 0.0017 ($F_{1,89}$=10.47) im Sinne niedrigerer Konzentrationen nach MPTP- als nach Kontrollbehandlung. Die Analyse für Serotonin wies in keinem Faktor einen p-Wert unter 0.20 auf.

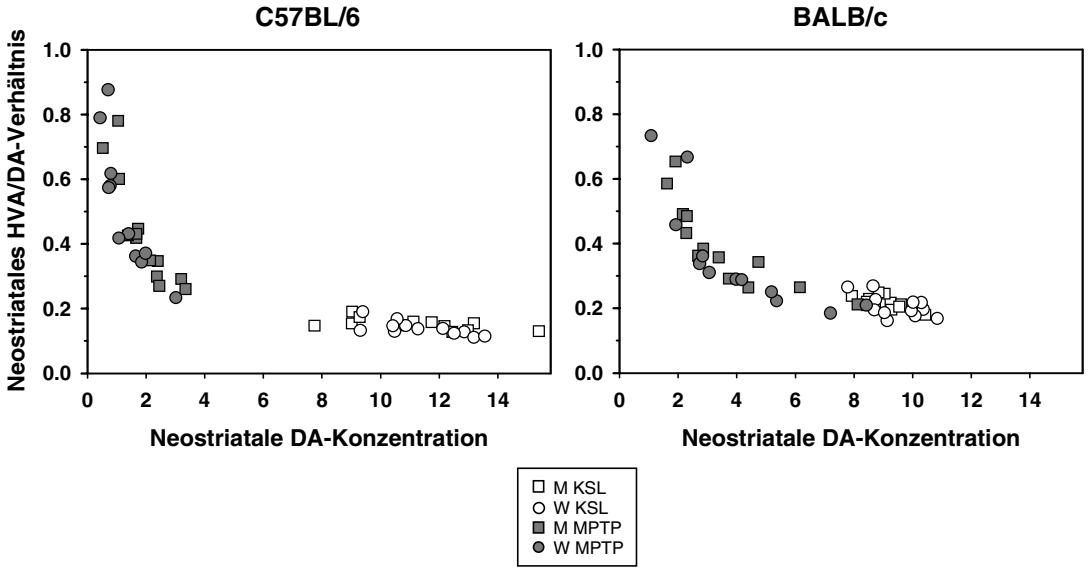

Abb. 23. Streuungsdiagramme für die neostriatalen DA-Konzentrationen (in µg/g Hirngewebe) und die zugehörigen HVA/DA-Verhältnisse. Dargestellt sind die individuellen Wertepaare für Männchen (M) und Weibchen (W) der Stämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten (n=97).

Die Streuungsdiagramme in Abb. 23 verdeutlichen die Beziehung zwischen dem neostriatalen DA-Gehalt und dem zugehörigen HVA/DA-Verhältnis. Zwischen diesen Maßen bestanden hohe negative Korrelationen in den MPTP-Gruppen sowohl von C57BL/6 (r= -0.85, p<0.001) als auch von BALB/c (r= -0.79, p<0.001). Diese deuten an, daß das Metabolit/Transmitterverhältnis um so höher lag, je niedriger die DA-Konzentration selbst war. In den Kontrollgruppen war ein solcher Zusammenhang ebenfalls vorhanden, hier lagen die Korrelationskoeffizienten jedoch etwas niedriger (r= -0.60, p=0.002 für C57BL/6 bzw. r= -0.62, p=0.001 für BALB/c)

ventrales Striatum (Abb. 24)

Bei der Auswertung der Transmitterkonzentrationen im ventralen Striatum ergaben sich hinsichtlich Dopamin p-Werte für den Faktor "Stamm" von p=0.0007 ($F_{1,88}$=12.41) im Sinne generell höherer Werte bei BALB/c und für "Behandlung" p<0.0001 ($F_{1,88}$=79.63), was eine Konzentrationsminderung nach MPTP signalisiert. Die zugehörigen DA-Depletionen betrugen 50% (C57BL/6) und 31% (BALB/c). In entsprechenden Varianzanalysen für die Transmitter NA und 5-HT lag kein p-Wert unter 0.20, für das Transmitterverhältnis HVA/DA gilt dies mit Ausnahme der Wechselwirkung "Stamm" x "Behandlung" ($F_{1,88}$=2.84, p=0.0958) ebenfalls.

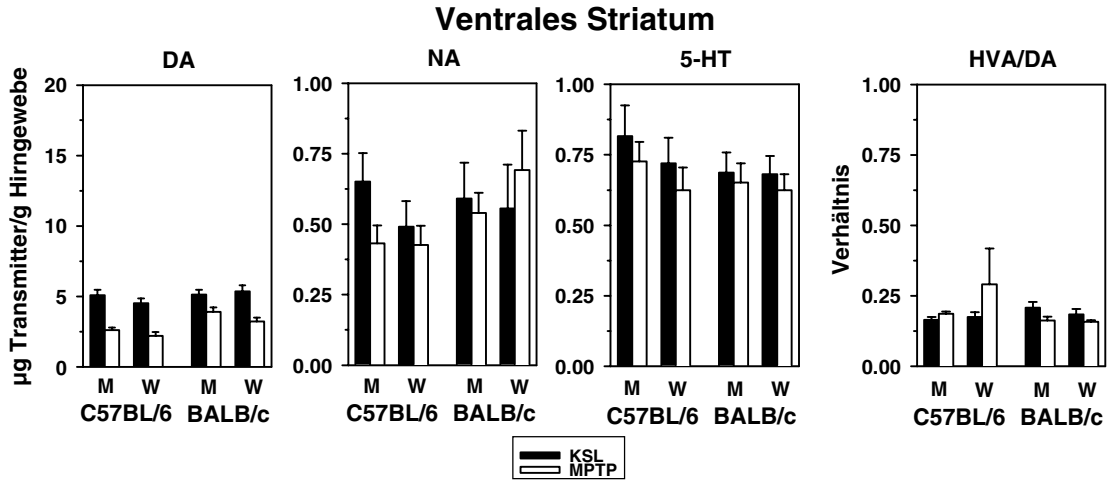

Abb. 24. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im ventralen Striatum. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP4x15 (weiße Balken) erhalten hatten (n=96).

4.2.3.2.3 Histologie

Die Zellzahlen in SN und VTA (Tabelle 7) wurden mittels ANOVA mit den Faktoren "Stamm", "Geschlecht" und "Behandlung" analysiert. Für die Substantia nigra ergaben sich dabei ein signifikanter Stammeffekt ($F_{1,78}$=18.63, p<0.0001) und eine signifikante Wechselwirkung "Stamm" x "Behandlung" ($F_{1,78}$=6.06, p<0.0160).

Tabelle 7. Mittlere Anzahlen TH-positiver Zellen in Substantia nigra (SN) und Area tegmentalis ventralis (VTA) von Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	C57BL/6				BALB/c			
	Männchen		Weibchen		Männchen		Weibchen	
	KSL (n=10)	MPTP (n=13)	KSL (n=9)	MPTP (n=11)	KSL (n=9)	MPTP (n=12)	KSL (n=10)	MPTP (n=12)
SN	231.0 ±26.3	169.7 ±20.6	216.8 ±19.6	167.2 ±19.0	243.0 ±33.2	286.0 ±9.8	259.7 ±22.9	251.9 ±14.3
VTA	128.6 ±16.7	113.1 ±9.3	118.6 ±11.5	130.5 ±6.3	148.1 ±21.6	156.0 ±9.8	148.1 ±13.5	147.9 ±13.7

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der durchschnittlichen Zellzahlen pro Hirnschnitt.

Bei einer *post hoc*-Testung ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und MPTP-Gruppe bei C57BL/6 (p=0.0474), nicht aber bei BALB/c (p=0.8349). Die Zellverluste in Prozent, bezogen auf die Kontrollgruppen, betrugen 25% bei C57BL/6 und -7% bei BALB/c. Die Kontrollgruppen (KSL) beider Stämme unterschieden sich nicht signifikant (p=0.6020). Die p-Werte der übrigen Faktoren und Wechselwirkungen lagen über 0.20.
Hinsichtlich der Daten aus der VTA erreichte allein der Haupteffekt "Stamm" einen p-Wert unter 0.20, im Sinne allgemein höherer Zellzahlen bei BALB/c-Mäusen ($F_{1,78}$=8.77, p=0.0040).

4.2.3.2.4 Letalität

Auch mit der Dosierung MPTP4x15 trat in allen MPTP-behandelten Gruppen Letalität auf. Tabelle 8 gibt die absoluten Anzahlen gestorbener Tiere und die entsprechenden Prozentwerte für diese Gruppen an. Die Mehrzahl der Todesfälle ereignete sich innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Behandlung. Es starben mehr Weibchen als Männchen. In den Kontrollgruppen (KSL-Behandlung) kam es dagegen nicht zu Todesfällen.

Tabelle 8. MPTP-bedingte Letalität von Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die eine Behandlung mit MPTP4x15 erhalten hatten.

	C57BL/6		BALB/c	
	Männchen (n=14)	Weibchen (n=14)	Männchen (n=14)	Weibchen (n=14)
Anzahl gestorbener Tiere	1	3	1	2
prozentualer Anteil	7%	21%	7%	14%

4.2.3.2.5 Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde über den Experimentalzeitraum hinweg an vier Meßzeitpunkten erfaßt, wobei unmittelbar nach der Messung an Tag 1 die Injektionsbehandlungen erfolgten (Tabelle 9). In den Kontrollgruppen waren kaum Änderungen zwischen den Gewichten an den Tagen 1 und 3 zu verzeichnen (d.h. vor und nach der Kontrollbehandlung), und auch bis zum Tag 7 blieb das Gewicht relativ konstant bzw. waren nur leichte Zunahmen zu beobachten.

Nach MPTP-Behandlung verringerte sich das Körpergewicht von Tag 1 zu Tag 3 geringfügig; dies ist konform mit der Tatsache, daß an Tag 1 bei vielen MPTP-behandelten Mäusen Aphagie und Adipsie beobachtet werden konnten. An Tag 5 stiegen die Mittelwerte der Körpergewichte bereits wieder an. Im allgemeinen Gewichtsniveau waren nennenswerte Stammunterschiede nicht zu verzeichnen, aber im Geschlechtsvergleich erwiesen sich die Weibchen als deutlich leichter als die Männchen.

Tabelle 9. Körpergewicht (in g, Mittelwerte und Standardfehler von Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	C57BL/6				BALB/c			
	Männchen		Weibchen		Männchen		Weibchen	
	KSL (n=12)	MPTP (n=13)	KSL (n=12)	MPTP (n=11)	KSL (n=12)	MPTP (n=13)	KSL (n=12)	MPTP (n=12)
Tag 1	24.9±1.1	25.1±0.6	19.2±1.0	20.2±0.4	24.2±0.5	24.6±0.7	18.3±0.7	18.8±0.3
Tag 3	24.5±0.7	24.0±0.6	18.9±0.5	19.0±0.5	24.0±0.5	23.7±0.8	18.9±0.4	18.1±0.3
Tag 5	25.3±0.6	25.3±0.5	19.6±0.4	20.3±0.4	24.2±0.3	24.3±0.6	19.0±0.4	18.7±0.3
Tag 7	25.9±0.6	25.6±0.6	19.7±0.5	19.8±0.3	24.3±0.4	24.3±0.6	19.1±0.4	19.5±0.7

Die Messung an Tag 1 erfolgte unmittelbar vor der Behandlung mit KSL bzw. MPTP.

4.2.3.2.6 Beziehungen zwischen Verhaltensmaßen im Offenfeld und neuralen Parametern

In Tabelle 10 sind korrelative Beziehungen zwischen der zurückgelegten Strecke und der Aufrichtdauer im Offenfeld einerseits und der neostriatalen DA-Konzentration sowie der mittleren Zahl TH-positiver Zellen pro Hirnschnitt in der Substantia nigra andererseits für MPTP-behandelte Tiere angegeben. Bei C57BL/6 fielen die Werte für Tag 1, den Tag der Behandlung, niedrig aus; für Tag 2 waren relativ hohe Korrelationen zwischen den vier Parametern festzustellen, und dies galt für die Beziehung zwischen den Aufrichtungen und dem DA-Spiegel auch an den folgenden beiden Tagen. Bei BALB/c lagen alle Korrelationskoeffizienten sehr niedrig; auch für die Kontrollgruppen (KSL) beider Stämme waren die Koeffizienten relativ niedrig (Anhang, Tabelle A-4).

Darüber hinaus deutet sich auch zwischen den beiden neuralen Parametern bei MPTP-behandelten C57BL/6-Mäusen ein korrelativer Zusammenhang an (r=0.47, p=0.020), nicht aber bei BALB/c (r=0.12, p=0.583).

Tabelle 10. Produkt-Moment-Korrelationen zwischen Verhaltensparametern im Offenfeld und neuralen Parametern von Mäusen der Stämme C57BL/6 und BALB/c, die eine Behandlung mit MPTP4x15 erhalten hatten.

	Tag 1		Tag 2		Tag 3		Tag 4	
	Loko-motion	Aufrich-tungen	Loko-motion	Aufrich-tungen	Loko-motion	Aufrich-tungen	Loko-motion	Aufrich-tungen
C57BL/6 (n=24)								
striatales DA	0.16	0.31	**0.71**	**0.68**	0.31	**0.49**	0.13	**0.57**
Zellen in SN	0.32	0.36	**0.59**	**0.43**	0.32	0.27	0.19	0.22
BALB/c (n=23)								
striatales DA	0.12	-0.01	0.21	0.12	-0.11	-0.13	-0.17	-0.09
Zellen in SN	0.12	0.22	0.15	-0.13	0.22	-0.26	0.26	0.02

Lokomotion = zurückgelegte Strecke; Aufrichtungen = Gesamtdauer aller Aufrichtungen; striatales DA = neostriatale Dopaminkonzentration; Zellen in SN = mittlere Anzahl TH-positiver Zellen pro Hirnschnitt in der Substantia nigra. Die Stichproben setzen sich zusammen aus Männchen und Weibchen. Korrelationen mit p<0.05 sind fett gedruckt.

4.2.4 Diskussion

Dieses Experiment, bei dem männliche und weibliche Mäuse der Stämme C57BL/6 und BALB/c mit dem Neurotoxin MPTP behandelt worden waren, hatte das Hauptziel, einen um-

fassenden Datensatz hinsichtlich der Auswirkungen des Neurotoxins in den genannten Stämmen zu gewinnen. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob differentielle Effekte zu beobachten sind, d.h. ob in den beiden Stämmen und Geschlechtern nach Gabe der gleichen MPTP-Dosis unterschiedlich starke (neuro-)toxische Effekte auftreten würden. Da es bei unseren ersten Versuchen zu unerwarteten selektiven Letalitätseffekten kam, wurde das Experiment um das Ziel erweitert, eine geeignetere Dosis als die initial benutzte zu finden. Bevor die eigentlichen Ergebnisse mit der als geeignet identifizierten Dosis besprochen werden, sollen zunächst die Ergebnisse dieser Dosisfindung diskutiert werden.

Zu Beginn wurde anhand der Literatur ein oft beschriebenes Dosierungsschema ausgewählt, bei dem vier intraperitoneale Injektionen in 2-Stunden-Intervallen verabreicht werden (z.B. [6,78,79,166,357]) Als verabreichte Menge pro Injektion verwendeten wir zunächst 20 mg MPTP-HCl. Diese Dosierung (MPTP4x20) führte zu zwei differentiellen Effekten: Erstens zeigte sich eine Stammabhängigkeit der MPTP-Wirkung darin, daß es bei C57BL/6-Männchen zu einem massiven neostriatalen Dopaminverlust von 94% kam, während dieser bei BALB/c-Männchen mit 24% deutlich niedriger ausfiel. Zweitens unterschieden sich bei beiden Stämmen die Geschlechter dahingehend, daß bei den MPTP-behandelten Weibchen eine komplette Mortalität beobachtet wurde, wogegen alle Männchen die Neurotoxingabe überlebten. Dies war insofern überraschend, weil zwar das Phänomen der Letalität nach MPTP-Gabe mehrfach beschrieben wurde [121,152,470], jedoch eine besonders ausgeprägte Anfälligkeit von Weibchen bislang allenfalls am Rande erwähnt worden war [215]. Da im Rahmen der von uns beabsichtigten QTL-Analyse sowohl männliche als auch weibliche Tiere untersucht werden sollten, mußte eine Dosis gefunden werden, die eine geringe Letalität mit einer ausreichend hohen neurotoxischen Wirkung verbindet. Zwei weitere Dosen, bei denen die Gabe der Dosis auf einen längeren Zeitraum verteilt (MPTP2x20x2) bzw. die Dosis halbiert wurde (MPTP 4x10), zeichneten sich dadurch aus, daß hier keine Letalität auftrat. Das Dosierungsschema MPTP2x20x2 erzeugte bei C57BL/6-Männchen eine um ca. 20 Prozentpunkte niedrigere DA-Depletion als MPTP4x20, eine Dosierung, bei der die gleiche Substanzmenge massierter appliziert wird. Noch geringer fiel der DA-Verlust bei MPTP4x10 aus. Eine Ausnahme von dieser Beschreibung bilden allerdings die BALB/c-Männchen, die bei den beiden letztgenannten Dosierungen höhere striatale DA-Defizite aufwiesen als bei der anfänglichen Dosis MPTP4x20, und die C57BL/6-Weibchen mit einer recht hohen Depletion bei MPTP4x10; für diese Abweichungen gibt es keine befriedigende Erklärung, es läßt sich aber nicht ausschließen, daß, obwohl allein angesichts des Gefährdungspotentials der hochto-

xischen Substanz mit größtmöglicher Sorgfalt gearbeitet wurde, zu Beginn der Studie die Injektionsprozedur noch gewissen Schwankungen in der Ausführung unterworfen war, was sich bei den kleinen Stichprobengrößen in den Mittelwerten deutlich bemerkbar machen könnte. Davon abgesehen, bestätigen unsere Ergebnisse frühere Studien, die für MPTP einerseits eine Dosis-Wirkungsbeziehung hinsichtlich der Neurotoxizität [396,470] und der Letalität [470] fanden und die andererseits auch zeigten, daß eine massierte MPTP-Gabe eine stärkere neurotoxische Wirkung entfaltet als eine über einen längeren Zeitraum verteilte gleich hohe Substanzmenge [34]. In das Bild der geschilderten Dosis-Wirkungs-Beziehungen fügen sich auch sehr gut unsere Befunde mit der Dosierung MPTP4x15 (Details siehe weiter unten). Diese Dosierung wurde schließlich gewählt, weil nach MPTP4x10 nur äußerst kurzfristige Verhaltensänderungen auftraten, während bei der Dosierung MPTP2x20x2 die ökonomische Überlegung hinzukam, daß diese eine Verlängerung der Untersuchung um einen Tag bei jedem Tier erfordert hätte - bei einer veranschlagten Zahl von mehreren hundert zu testenden Tieren ein relevanter Faktor.

Wie im folgenden erörtert werden soll, eignete sich das Wirkungsprofil der Dosierung MPTP4x15 hingegen gut, um vielfältige Beobachtungen bezüglich der Wirkungsweise von MPTP in beiden Geschlechtern von C57BL/6- und BALB/c- Mäusen anstellen zu können. In der Vergangenheit wurde wiederholt gezeigt, daß sich die Anfälligkeit für MPTP hinsichtlich neurochemischer und histologischer Läsionsmaße zwischen Mausstämmen unterscheiden kann (z.B. [166,167,410]). Unsere Ergebnisse bestätigen dies für die beiden genannten Stämme und zeigen zusätzlich auch Verhaltensunterschiede in der Reaktion auf MPTP-Gabe auf. Diese Betrachtungsebene war - mit wenigen Ausnahmen [46,332] - bei bisherigen Stammvergleichen unbeachtet geblieben.

Auf der Verhaltensebene zeigten die beiden Stämme unterschiedliche, zeitabhängige Veränderungen nach MPTP-Gabe: Während die Lokomotion im Offenfeld bei den Kontrolltieren über die vier Testungen hinweg nur geringe Unterschiede aufwies, konnte in den MPTP-Gruppen am Tag der Behandlung in beiden Stämmen ein massiver Rückgang der Fortbewegungsaktivität beobachtet werden. BALB/c-Tiere erreichten bereits am darauffolgenden Tag wieder das Niveau ihrer Kontrollgruppe, wogegen bei C57BL/6-Tieren eine vergleichbare Erholung erst an Tag 3 eintrat. Für die beschriebene Datenstruktur eignete sich der lineare Trend a_1, der einen Regressionsparameter darstellt, zur Quantifizierung dieser Kurvenverläufe: Er gibt den mittleren Verlauf der Kurven über die vier Meßzeitpunkte wieder; bei den Kontroll-

tieren lag dieser Kennwert aufgrund des flachen Kurvenverlaufs nahe Null. Da MPTP-Gabe bei BALB/c zu einem kurzfristigen Lokomotionsdefizit führt, lag der Regressionskennwert hier höher, und am höchsten war dieser im Stamm C57BL/6, durch dessen Datenpunkte im Mittel die steilste Regressionsgerade verläuft. Die Berechnung derartiger Kennwerte ermöglicht eine Datenreduktion und eine zusätzliche Betrachtungsweise der Daten. Es soll an dieser Stelle nur erwähnt, aber nicht weiter vertieft werden, daß die Parameter unter sorgfältiger Berücksichtigung der Rohdaten interpretiert werden müssen und daß ihre Eignung von der konkreten Datenstruktur abhängig ist. (Träte beispielsweise bei MPTP-behandelten Tieren eine gleichbleibend schlechte Leistung ohne Erholung auf, wäre der Koeffizient a_1 gleich dem der Kontrolltiere; in diesem Fall eignete sich der Koeffizient a_0, der die Lage einer Kurve angibt, besser zur Beschreibung von Unterschieden.) Berücksichtigt man die Tatsache, daß an Tag 1, d.h. unmittelbar nach den MPTP-Injektionen, beide Stämme vergleichbar starke Defizite aufwiesen, eignet sich dieser Tag im Gegensatz zu Tag 2 offenbar nicht zur Aufdeckung von Stammunterschieden. Während die akute Reaktion an Tag 1 eine Reihe von zentralen und peripheren Ursachen haben könnte, ist zu vermuten, daß hinter der an den folgenden Tagen stattfindenden Erholung spezifischere Einflußgrößen stehen: Eine Möglichkeit stellen z.B. unterschiedliche zeitliche Verläufe von Kompensationsmechanismen dar, eine andere Erklärungsmöglichkeit für die stammspezifischen Erholungskurven könnte in unterschiedlichen residualen DA-Spiegeln und ihrer möglichen Änderung über die Zeit begründet sein. Da wir uns in dieser Studie jedoch bewußt darauf beschränkt haben, neurochemische Parameter nur 7 Tage nach der Behandlung *post mortem* zu messen, müssen derartige Vermutungen spekulativ bleiben. Allerdings sprechen die Verläufe der funktionellen Erholung der Lokomotion bei verschiedenen Dosierungen in C57BL/6-Männchen, die um so länger dauerten, je höher die Dosis und die resultierende DA-Depletion waren, dafür, daß die zweitgenannte Möglichkeit tatsächlich von Bedeutung ist. Auch die Tatsache, daß bei C57BL/6 die Korrelationen nach MPTP zwischen der Lokomotion an Tag 1 und nigrostriatalen Parametern nur niedrig, jedoch an Tag 2 sehr ausgeprägt war, deutet darauf hin, daß die akuten Verhaltensdefizite vermutlich auch auf andere als dopaminerge Veränderungen zurückgehen, während die zurückgelegte Strecke an Tag 2 ein guter Prädikator für den nigrostriatalen DA-Gehalt und die nigralen Zellzahlen, wie sie erst 6 Tage später gemessen werden, ist. Tag 2 bildet interessanterweise etwa den Mittelpunkt des Zeitraums, in dem sich das Gros der funktionellen Erholung abspielt. Ferner ist die Tatsache, daß im Gegensatz zur Lokomotion die Aufrichtungsdauer im Offenfeld bei C57BL/6 auch an den Tagen 3 und 4 mit dem neostriatalen DA-Spiegel korreliert, aus dem Grund bemerkenswert, weil zu diesem Zeitpunkt die Tiere auch im Aufricht-

verhalten im Mittel bereits das Kontrollniveau erreicht haben. Daß die Variation dieses Parameters dennoch Information über den Zustand des nigrostriatalen Systems zu beinhalten scheint, belegt erneut, daß die Erfassung des Aufrichtverhalten im MPTP-Mausmodell sehr nützlich sein kann (siehe dazu auch Kapitel 1.4.4.2 und [373]). Dies ist jedoch nicht der Fall bei BALB/c, bei denen zumindest die Weibchen auch an den Tagen 3 und 4 im Aufrichtverhalten noch nicht das Kontrollniveau aufweisen; hier scheint - zumindest unter der vorliegenden mäßigen Läsionsstärke - keine Kopplung des Leistungsniveaus an nigrostriatale Funktionen zu bestehen.

Neben dem Rückgang motorischer Aktivität war im Offenfeld auch eine starke Abnahme der Defäkation nach MPTP-Gabe und die Erholung auf Kontrollniveau an darauffolgenden Tagen zu beobachten. Dieser Effekt von MPTP ist nach unserer Kenntnis bisher nicht beschrieben worden. Mehrere Ursachen sind denkbar: Erstens könnte es eine Folge der verringerten Nahrungsaufnahme sein. Es gibt Hinweise, daß das nigrostriatale System auch Verhaltensweisen im Zusammenhang mit Nahrungsaufnahme partiell beeinflussen könnte [12], und einige Autoren haben Adipsie und Aphagie bzw. Gewichtsabnahme infolge einer MPTP-Behandlung beschrieben [111,118,121]. Tatsächlich beobachteten wir regelmäßig - hauptsächlich an Tag 1 - eine drastische Verminderung der Nahrungs- und Wasseraufnahme, die eventuell zu der von uns ebenfalls gemessenen, vorübergehenden leichten Abnahme des Körpergewichts und Verminderung der Kotproduktion geführt hat. Zweitens ist denkbar, daß MPTP oder dessen Metaboliten über ihre Wirkung auf periphere Katecholamine, insbesondere Noradrenalin [147], das an der Steuerung der gastrointestinalen Aktivität beteiligt zu sein scheint [155], beispielsweise die Darmperistaltik verändern könnten. Drittens könnte auch die stark verringerte motorische Aktivität rein mechanisch zu einer mangelnden Funktion der Darmperistaltik beitragen. Ein weiterer auffälliger Effekt bestand darin, daß auch in den Kontrollgruppen die Defäkation mit wiederholter Exposition im Offenfeld anstieg. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich nicht auf die allen Tiere gemeinsame Injektionsbehandlung, von der sich die Tiere eventuell erholen mußten, zurückzuführen, da wir dieselbe Beobachtung erstens auch schon im Vorversuch, in dem keinerlei Injektionen vorgenommen worden waren, und zweitens auch bei wiederholter Testexposition im Plus-Maze, in dem wir ebenfalls die Defäkation bestimmt haben (Anhang, Tabelle A-5), gemacht hatten. Gewöhnlich wird die Defäkation als Maß für Emotionalität verwendet, wobei eine höhere Zahl von Boli im Sinne von höherer Ängstlichkeit aufgefaßt wird [128]. Nach dieser Interpretation würden unsere Ergebnisse in den Kontrollgruppen auf einen Anstieg von Emotionalität hindeuten. Dies erscheint zwar nicht wahr-

scheinlich, da unser Offenfeld keine offensichtlich unangenehmen Reize liefert, kann natürlich aber nicht ausgeschlossen werden (denkbar wäre beispielsweise eine Angstkonditionierung in Hinblick auf die Handhabung durch den Experimentator). Jedoch haben auch andere Autoren einen Defäkationsanstieg bei Mäusen berichtet [438,439,446], während bei Ratten ein Abfall mit Testwiederholung als typisch beschrieben wurde [18]. Insofern stellt sich die Frage, ob es sich bei dieser Tendenz um ein Charakteristikum der Spezies Maus handelt, das nicht im Sinne von Emotionalität interpretiert werden sollte.

Ein andere Verhaltensklasse, in der als Folge der MPTP-Behandlung zwischen den beiden Stämmen deutliche Unterschiede zutage traten, wurde nicht in einer speziellen Testumgebung, sondern in den Heimkäfigen der Tiere beobachtet. Es handelte sich um Nestbauverhalten; dieses kann einerseits bei Weibchen als Brutpflegeverhalten auftreten [48], hat darüber hinaus aber thermoregulatorische Funktion und wird bei Vorhandensein geeigneten Materials von beiden Geschlechtern in nahezu allen Mausstämmen gezeigt [380,381]. Tatsächlich begannen in unserer Untersuchung die Kontrolltiere bereits nach kurzer Zeit, das bereitgestellte Zelltuch zu bearbeiten, so daß nach einem Tag fast alle C57BL/6- und sämtliche BALB/c-Tiere eine Manipulation des Materials vorgenommen hatten. In den MPTP-Gruppen zeigte sich wiederum ein differentieller Verhaltenseffekt, da hier bei C57BL/6 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Verzögerung des Nestbaubeginns auftrat, bei BALB/c dagegen allenfalls minimal. Bei der Interpretation des verzögerten Nestbaubeginns sind mehrere Dinge zu berücksichtigen: Einerseits bewirkt MPTP einen Anstieg der Körpertemperatur, der aber nach weniger als 60 Minuten von einem länger andauernden Absinken der Temperatur um mehrere °C gefolgt wird [147]. Dieser Effekt einer Auskühlung wurde in unserem Experiment zwar nicht gemessen, wurde aber von den Experimentatoren bei der Handhabung der Tiere häufig subjektiv wahrgenommen, teilweise sogar mehr als 24 Stunden nach der Behandlung, und war bei stark akinetischen Tieren scheinbar besonders ausgeprägt, so daß dadurch prinzipiell der Anreiz für thermoregulatorischen Nestbau *steigen* müßte. Andererseits ist nicht auszuschließen, daß MPTP die Temperaturwahrnehmung beeinträchtigen könnte, was dazu führen würde, daß für die Tiere subjektiv kein Bedarf für thermoregulatorischen Nestbau bestünde. Zwar sind sensorische Defizite im MPTP-Modell berichtet worden [349,449,451], unseres Wissens liegen aber keine Befunde zu Defiziten der Temperaturwahrnehmung vor. Plausibler erscheint die Annahme, daß die Defizite im Nestbau auf sensomotorischen Defiziten beruhen, da beim Nestbauverhalten maßgeblich der orofaziale Bereich und die Vorderpfoten eingesetzt werden; es ist belegt, daß diese Bereiche auf striatale Läsionen funktionell empfindlich rea-

gieren [205,384], so daß begründbar wäre, daß der Stamm mit dem deutlich stärkeren striatalen DA-Verlust (C57BL/6) auch die ausgeprägteren Defizite beim Nestbau aufweist. Für diese Interpretation spricht auch, daß der Einsatz des Nestbaus interessanterweise zeitlich eng mit der jeweiligen funktionellen Erholung der beiden Stämme im Offenfeld zusammenfällt.
Bezüglich des Parameters "Beginn der Bearbeitung von Zellstoff" könnte eingewendet werden, daß dieser eventuell gar keinen Nestbau widerspiegelt, sondern lediglich eine Tendenz, bestimmte Materialien zu zerkleinern (vergleichbar dem "shredding" bei Wüstenspringmäusen [14]). Dagegen spricht jedoch unsere (nicht systematisch durchgeführte) Beobachtung, daß in der Regel aus diesem Material, teilweise in Verbindung mit der Einstreu, äußerst akkurate, kreisförmige Nester geformt wurden, in denen sich die Tiere aufhielten. Selbst unter der Annahme, daß es sich "nur" um Shredding handelte, bliebe das verwendete Maß aber dennoch interessant, da es ganz offensichtlich Verhaltensänderungen nach einer MPTP-Behandlung abbilden kann.
In weiteren Verhaltenstests zeigten sich zwar Stamm- oder Behandlungseffekte, aber es war nicht möglich, mit diesen stammabhängige Reaktionsunterschiede auf MPTP zu quantifizieren. Im Greif-Test beispielsweise ist die Auswertung durch die hohe Zahl qualitativ verschiedener Verhaltensweisen deutlich erschwert; zu den vier bereits aus dem Vorversuch bekannten kam noch eine fünfte Kategorie hinzu, da einige MPTP-behandelte Tieren während der gesamten Testdauer nahezu regungslos am Drahtseil hängenblieben. Dies ist insofern interessant, da dies als Akinesie aufgefaßt werden könnte und somit ein typisches Parkinson-artiges Symptom darstellte, es verschärft jedoch das Auswertungsproblem. Mögliche Abhilfen wären Kategorisierung, grobes Rating des Greifverhaltens (siehe [17]) oder komplexe Videoanalyse von definierten Verhaltenscharakteristika wie der Dauer des Schwanzeinsatzes beim Klettern (siehe [165]); zugehörige Probleme sind jedoch die starke Unübersichtlichkeit der Ergebnisse bei Verwendung von Kategorien angesichts der vielen Gruppen in unserem Experiment, die unserer Erfahrung nach nicht sehr reliable Beobachtbarkeit des Greifverhaltens und der immense zusätzliche Zeitaufwand bei Videoauswertung. Wir entschieden uns daher, das aus dem Vorversuch bekannte Kriterium "Betretens der Plattform" trotz der damit vorhandenen Datenreduktion beizubehalten. Damit stellten wir fest, daß in MPTP-behandelten Gruppen der Anteil von Tieren, die das Kriterium erreichten, unmittelbar nach Behandlung deutlich niedriger lag als in den Kontrollgruppen und während der folgenden Tage anstieg. Augenscheinlich (d.h. nicht statistisch belegt) verlief dieser Anstieg bei BALB/c sogar rascher als bei C57BL/6, dem Erholungsverlauf bei der Offenfeld-Lokomotion somit ähnlich. Jedoch handelt es sich bei dieser Form der Auswertung insofern um ein unscharfes Verfahren, da auch in der

Kontrollbedingung nicht alle Tiere das Kriterium erreichen und sich die Kategorisierung 0-1 deshalb im Einzelfall nicht befriedigend zur Vorhersage des Läsionsgrades nach MPTP eignet. Insbesondere im Hinblick auf die geplante QTL-Analyse wären solche "unscharfen" Variablen wenig erfolgversprechend, um mit MPTP-Suszeptibilität verbundene Genorte aufzudecken. Eine Konsequenz dieser Überlegungen bestand deshalb in der Entscheidung, diesen Test in nachfolgenden Generationen nur noch an zwei statt vier Tagen durchzuführen (ein völliger Verzicht wurde vermieden, um den Tieren zwecks besserer Vergleichbarkeit zwischen den Generationen weiterhin diese Testerfahrung zukommen zu lassen).

Das Rotarod war - zumindest unter unseren Bedingungen - nicht geeignet, um die beiden Stämme in Hinblick auf MPTP-Effekte zu vergleichen. Zum einen wurde die Leistung durch MPTP insgesamt nur sehr moderat beeinflußt, zum anderen bestanden bereits in der Kontrollbedingung starke Niveauunterschiede zwischen den beiden Stämmen; letzteres wurde auch in einer anderen Studie gefunden [351]. Die gegenüber dem Vorversuch veränderte, etwas "griffigere" Oberfläche der Walze führte nicht dazu, daß sich Tiere vom BALB/c-Stamm wesentlich länger darauf halten konnten; die Leistung dieser Tiere ist also von vornherein sehr gering, so daß aufgrund dieses Bodeneffektes etwaige Leistungsverschlechterungen kaum nachweisbar wären. Prinzipiell könnte durch ein Vortraining möglicherweise eine Ausgangssituation geschaffen werden, in der sich die beiden Stämme auf hohem Niveau nicht (wesentlich) unterscheiden (siehe [274]). Angesichts des äußerst geringen Leistungsanstiegs bei den Kontrolltieren dieses Stammes über die 4 Testtermine hinweg ist jedoch fraglich, ob sich dies in einem ökonomisch vertretbaren zeitlichen Rahmen durchführen ließe. Interessant ist, daß in einer anderen Studie beide Stämme etwa gleich gut im Rotarod abschnitten [348]; ein wesentlicher Unterschied war dort, daß das Rotarod, von einer deutlich langsameren Geschwindigkeit ausgehend, auf eine schnellere als von uns verwendete beschleunigte; dies verdeutlicht, daß die Sensitivität dieses Tests für MPTP-bedingte Effekte durch Wahl anderer Testbedingungen wahrscheinlich verbessert werden kann (eine Beschleunigungsfunktion war bei unserem Rotarod-Gerät jedoch nicht vorhanden); so wiesen mehrere Autoren in einzelnen Stämmen z.T. deutliche MPTP-bedingte Leistungsdefizite im Rotarod nach [76,108,352,353].

Verhaltensmessungen mit dem Pole-Test führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen in den beiden Stämmen. C57BL/6-Kontrolltiere bewältigten die Aufgabe wie von Ogawa et al. [317] beschrieben; dies geschah sogar rascher als im Vorversuch, so daß vermutet werden kann, daß die geringere Beleuchtung im aktuellen Experiment das Betreten des Bodens be-

günstigte. MPTP-Behandlung führte erwartungsgemäß zu einem deutlichen Anstieg der Aufenthaltszeiten am ersten Tag mit einer Erholung auf Kontrollniveau, die im Zeitverlauf derjenigen des Offenfeldverhaltens ähnlich ist. Bei BALB/c lagen die Aufenthaltszeiten insgesamt deutlich höher, was damit zusammenhängt, daß die erwünschte Verhaltenskette nicht einmal von der Hälfte der Kontrolltiere gezeigt wurde, tatsächlich sogar häufiger in der Gruppe der MPTP-behandelten Tiere auftrat. Das bedeutet konkret, daß viele Tiere während der gesamten Testdauer von maximal 120 s auf der Stange geblieben sind. Die Tatsache, daß BALB/c-Tiere im Schnitt deutlich mehr als die eine erforderliche 180°-Drehung machten und oft unmittelbar über dem Boden kehrt machten, spricht eher gegen motorische Defizite als Erklärung. Das Ergebnismuster läßt den Pole-Test unter den vorliegenden Bedingungen für den Stamm BALB/c nicht als brauchbaren Test zur Ermittlung von Verhaltensdefiziten im MPTP-Mausmodell erscheinen. Anders als beim Rotarod würde vermutlich auch ein vorgeschaltetes Training keine Abhilfe bieten, da bei den Männchen bei Testwiederholung die Tendenz, den Boden zu betreten, sogar weiter abnahm. Vielmehr wäre es wichtig, die Einflußgrößen zu kennen, die BALB/c-Mäuse zu ihrem abweichenden Verhalten verleiten. Es kann nur spekuliert werden, daß es sich z.B. um motivationale/emotionale Faktoren handeln könnte (beispielsweise könnte das Betreten des Bodens angstbesetzt sein oder der Drang zum Klettern überwiegen).

Eine methodische Schwierigkeit betrifft sowohl den Pole-Test als auch das Rotarod: Da wir - wie andere Autoren auch - maximale Beobachtungszeiten festgelegt haben, kann es in beiden Testverfahren zur Erhebung zensierter Daten kommen. Ein Gruppenmittelwert spiegelt dann nur bedingt die tatsächliche Leistung in dieser Gruppe wider. Dies ist ein realistisches Problem, da wir in etlichen Fällen Maximalleistungen registrierten. Wollte man die Daten statistisch auswerten, müßte dies mit komplexen Verfahren für zensierte Daten geschehen, ein Aufwand, auf den angesichts der vorliegenden Fragestellung verzichtet worden war, da beide Verhaltenstests offenbar keinen direkten Vergleich der MPTP-Wirkung zwischen den Stämmen erlauben. Es soll hier nur angemerkt, daß diese Problematik sich bei anderen Autoren, die mit denselben Tests gearbeitet haben und zweifelsohne ebenfalls Tiere mit "künstlichen" Maximalwerten beobachtet haben, nicht in der Wahl eines statistischen Verfahrens für zensierte Daten niedergeschlagen hat (siehe dazu die entsprechenden Referenzen aus Kapitel 1.4.4).

Hinweise auf Stamm- und Geschlechtsunterschiede fanden sich im Elevated Plus-Maze, dessen offene Arme von BALB/c-Weibchen länger als von allen anderen Gruppen betreten wurden. Ein Stammunterschied in Richtung geringerer Emotionalität bei BALB/c ist in Übereinstimmung mit anderen Autoren, die ebenfalls die von uns eingesetzten Stämme im Plus-Maze untersucht haben [84,176,348,430], wogegen die eher geringere Emotionalität von Weibchen von anderen nicht gefunden wurde [84]. Die im Vergleich zum Vorversuch insgesamt höheren Offenarmzeiten lassen vermuten, daß die im aktuellen Experiment gewählte schwächere Beleuchtung tatsächlich das Betreten der offenen Arme forciert hat. Im Gegensatz zu den genannten Unterschieden läßt sich aus den Plus-Maze-Daten jedoch kein Einfluß von MPTP auf die Emotionalität herauslesen; obwohl uns hierzu keine Daten anderer Arbeitsgruppen vorliegen, war die Suche nach einer etwaigen Verbindung von Interesse aufgrund der Tatsachen, daß der Neurotransmitter DA in Emotionalitätssteuerung involviert zu sein scheint [347] und sich andererseits die zentrale Wirkung von MPTP trotz einer relativen Selektivität für das nigrostriatale System auch auf andere Systeme und Transmitter erstrecken kann. Die Testung war an Tag 3 durchgeführt worden und somit zu einem Zeitpunkt, an dem im Offenfeld zu großen Teilen funktionelle Erholung stattgefunden hatte; dies war bewußt geschehen, da die Interpretation des Verhalten durch starke Akinesie erschwert wäre, wirft aber die - anhand unserer Daten nicht beantwortbare - Frage auf, ob eine MPTP-Behandlung überhaupt keine Auswirkungen auf Ängstlichkeit hat oder ob entsprechende zentrale Funktionen bereits in einem Maße erholt waren, daß ein Effekt im Plus-Maze zu diesem Zeitpunkt nicht mehr meßbar war.

Neben Verhaltensmaßen aus Offenfeld und Nestbau legten auch die neurochemischen Analysen Wechselwirkungen zwischen Stämmen und Behandlungen offen. Der Vergleich zwischen den Kontrollgruppen der Stämme zeigte, daß C57BL/6-Tiere die höheren neostriatalen Dopaminkonzentrationen aufwiesen; dies ist in der Tendenz auch von einigen anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden [387,396], es gibt jedoch auch Gegenbefunde [200]. Die systemische Behandlung mit MPTP führte zu einem eindrucksvollen Verlust an DA, der mit ca. 85% bei C57BL/6 ungleich höher ausfiel als mit 59% bei BALB/c. Diese Ergebnisse zeigen zum einen deutlich, daß MPTP - wie in zahlreichen Studien bereits demonstriert (siehe Tabelle 1) - zuverlässig als dopaminerges Neurotoxin wirkt. Zum anderen ist aus diesen Ergebnissen ersichtlich, daß eine definierte Menge MPTP in diesen Stämmen unterschiedlich starke Wirkungen hervorruft, was frühere Beobachtungen bestätigt [200,396]. Ein differentieller Effekt zeichnete sich auch für das Transmitterverhältnis HVA/DA ab, das sich in der Kontroll-

bedingung (KSL) zwischen den Stämmen offenbar nicht unterschied, aber nach MPTP anstieg, und hier stärker bei C57BL/6 als bei BALB/c. Derartige Erhöhungen nach striatalen Läsionen werden vielfach als Indikator für einen kompensatorischen Anstieg des residualen DA-Metabolismus und wiederum als eine physiologische Grundlage funktioneller Erholung angesehen; daß diese Erhöhungen kompensatorische Bedeutung haben, wird auch durch die hohen Korrelationen zwischen den HVA/DA-Quotienten und den residualen DA-Spiegeln gestützt. Dieses Kompensationsphänomen wurde modellübergreifend beobachtet, in MPTP-behandelten Mäusen [377,470] ebenso wie in 6-OHDA-behandelten Ratten [129,372]. Neben Änderungen in dopaminergen nigrostriatalen Parametern deutete sich auch ein Konzentrationsabfall des Katecholamins Noradrenalin, nicht aber des Indolamins Serotonin als Folge von MPTP an. Dieses Ergebnis belegt, daß das Neurotoxin MPTP trotz seiner oftmals betonten Selektivität (z.B. [65,156,161,202,294]) in seiner Wirkung nicht völlig auf dopaminerge Systeme beschränkt bleibt. Auch andere Autoren haben nach MPTP noradrenerge Defizite festgestellt [46,102,183,317], wogegen für Serotonin sowohl Verlust [212,410] als auch akuter Anstieg [294,414] als auch unveränderte Konzentrationen [11,183] berichtet wurden.

Im ventralen Striatum, der anderen von uns untersuchten dopaminerg innervierten Struktur, deuteten die Ergebnisse ebenfalls auf einen DA-Verlust nach MPTP-Behandlung hin. Dieser lag für beide Stämme erheblich niedriger als die vergleichbaren Werte im Neostriatum. Eine klare kompensatorische Erhöhung des Transmitterumsatzes fand sich bei diesem geringeren Läsionsausmaß nicht. Darüber hinaus lag die Depletion bei C57BL/6-Mäusen wiederum höher (um ca. 20 Prozentpunkte) als bei BALB/c. Obwohl die p-Werte einer entsprechenden ANOVA nicht erlauben, von einer Wechselwirkung zu sprechen, weist diese Konstellation doch numerisch in die Richtung einer höheren Suszeptibilität bei C57BL/6. Die - verglichen mit dem Neostriatum - geringere Läsionsstärke im ventralen Striatum ist analog zu der Konstellation in Gehirnen von Patienten mit Morbus Parkinson. Es ist häufig diskutiert worden, ob das ventrale Striatum Noxen, die für dopaminerge Neuronen potentiell schädlich sind, besser kompensieren kann. Im MPTP-Modell gibt es diesbezüglich einige Hinweise, daß im ventralen Striatum oxidativer Streß wegen höherer Kupfer-Zink-SOD-Aktivität besser bekämpft werden kann [204], daß der neurotrophe Faktor BDNF in höherer Konzentration vorhanden ist [203] oder daß zytotoxisches Kalzium aufgrund höherer Calbindin-Konzentrationen besser abgepuffert kann [310,358] als im Neostriatum.

Auch auf der dritten Betrachtungsebene, der Analyse von histologischen Veränderungen, wurden differentielle Läsionseffekte gefunden. Hier traten in der Substantia nigra nach MPTP Zellverluste um 25% bei C57BL/6 auf, während es bei BALB/c praktisch keine Änderungen gegenüber den Kontrollen gegeben hat. Im letztgenannten Stamm führte die verwendete Dosis MPTP4x15 also zu meßbaren Schädigungen nur auf der neurochemischen, nicht aber auf der histologischen Betrachtungsebene. Die Höhe des Zellverlusts bei C57BL/6 korrespondiert gut mit den Ergebnissen einer anderen Arbeit [211]. Das Befundmuster im Vergleich der beiden Stämme weist große Ähnlichkeit mit einer anderen Arbeit auf, in der der Stamm C57BL/6 mit dem MPTP-resistenteren Stamm FVB/N verglichen worden war und ebenfalls für FVB/N nur ein DA-, aber kein Zellverlust auftrat, wogegen bei C57BL/6 Schädigungen auf beiden Ebenen zu verzeichnen waren [166]. Darüber hinaus wurde eine derartige Dissoziation der MPTP-Wirkung zwischen Zellkörper und -terminalen auch in einer Studie festgestellt, in der eine protektive Behandlung nur auf der nigralen Ebene Schutz geboten hat [240]. Diese Befunde verdeutlichen, daß ein Dopaminverlust nicht unbedingt eine Folge von Zellverlust sein muß; auch eine beeinträchtigte Funktionalität des DA-Stoffwechsels könnte dafür verantwortlich sein, und es wurde z.B. auch gezeigt, daß die TH-Aktivität, die zur Synthese von DA erforderlich ist, durch MPTP-Einfluß abnimmt [9,283,302]. Eine einfache monotone Beziehung der neurochemischen und zellulären Läsionsparameter im MPTP-Modell ist danach nicht das wahrscheinlichste Szenario, sondern es könnte beispielsweise eine Art Schwelle im Transmitterrückgang geben, oberhalb derer erst bedeutsame Zellverluste auftreten. Obwohl dies von uns nicht systematisch geprüft wurde, paßt in dieses Bild auch, daß wir in der Area ventralis tegmentalis keinerlei Zellverlust beobachtet haben und daß im ventralen Striatum, das von dieser Region innerviert wird, die DA-Depletionen bei beiden Stämme niedriger lagen als die nigrostriatale Depletion im resistenteren der beiden Stämme, in dem ebenfalls kein Zellverlust aufgetreten war.

Über die exakten physiologischen Ursachen für die von uns gefundenen Unterschiede spekulieren zu wollen, wäre müßig; ein Überblick über die Vielfalt von potentiellen Erklärungsansätzen ist bereits in Kapitel 1.4.6 gegeben worden. Eine derartige Detail-Aufklärung war auch nicht Ziel dieses Experiments. Eine der in 1.4.6 genannte Möglichkeiten, nämlich ein Unterschied in der Anzahl a priori vorhandener dopaminerger Neuronen [307], wird allerdings durch unsere Daten kaum gestützt: Obwohl bei C57BL/6-Kontrolltieren die Zellzahlen in SN und VTA numerisch etwas geringer ausfallen als bei BALB/c, ist dieser Unterschied nicht signifikant, und es ist anzunehmen, daß bei BALB/c in der Ausgangssituation schon beträcht-

lich mehr Zellen vorliegen müßten, um daraus eine höhere Kompensationsfähigkeit ihres nigrostriatalen Systems ableiten zu können, die wiederum die beobachtete, 25 Prozentpunkte niedrigere striatale DA-Depletion erklären könnte.

Zusammengefaßt belegen die Ergebnisse unserer Untersuchung mit Hilfe verschiedener Meßmethoden deutlich und konsistent, daß der Mausstamm C57BL/6 anfälliger auf das Neurotoxin MPTP reagiert als BALB/c. Diesen anhand der Literaturangaben bereits vermuteten Unterschied zu verifizieren und präzise zu beschreiben, war das Hauptziel des Experimentes. Die beiden verglichenen Gruppen sind Inzuchtstämme, d.h. sie unterscheiden sich definiert genetisch voneinander, wogegen die Individuen *innerhalb* eines Stammes genetisch nahezu identisch sind. Für die Umweltbedingungen aller Tiere in unserem Experiment wurde von ihrer Geburt in der TVA an größtmögliche Gleichheit angestrebt. Berücksichtigt man diese Tatsachen, kann zumindest die deutliche Vermutung geäußert werden, daß die beobachteten Stammunterschiede - zumindest zu einem beträchtlichen Teil - genetisch begründet sind. Deshalb war diese hinsichtlich eines MPTP-Suszeptibilitätsunterschieds "positive" Befundlage maßgeblich für die Entscheidung, die Stämme im folgenden Schritt zu reziproken F1-Generationen zu verkreuzen und anhand der Phänotypisierung dieser Tiere erste grobe Anhaltspunkte über Vererbungsmodi für die MPTP-Anfälligkeit zu gewinnen. Die Ergebnisse dieses nächsten Schrittes eines QTL-Versuchsplans wird im folgenden Kapitel beschrieben. Abschließend soll noch erwähnt werden, daß wir nur sehr wenige Geschlechtsunterschiede fanden, die sich wiederum auf einige Verhaltenstests beschränkten, welche sich nicht als primär geeignet erwiesen, Stammunterschiede bzgl. der MPTP-Wirkung abzubilden. In Bezug auf die Letalität läßt sich festhalten, daß in absoluten Zahlen auf einem moderaten Niveau etwas mehr Weibchen als Männchen gestorben sind (das Phänomen der Letalität wird in den Abschnitten 4.4.4 und 4.6 ausführlicher besprochen). Die Daten der übrigen Verhaltens-, neurochemischen und histologischen Maße lieferten jedoch - im Gegensatz zu einigen anderen Studien [104,434] - keine Anhaltspunkte, daß Männchen und Weibchen unterschiedlich auf MPTP reagierten.

4.3 F1-Generation

4.3.1 Einleitung

Der Vergleich der Parentalstämme C57BL/6 und BALB/c ergab deutliche Unterschiede in ihrer MPTP-Anfälligkeit, was anhand verschieden starker Verhaltensdefizite, striataler DA-Verluste und nigraler Zellverluste nachgewiesen werden konnte. Somit war eine entscheidende Ausgangsbedingung für eine QTL-Analyse erfüllt, nämlich ein phänotypischer Unterschied zwischen den Ausgangsstämmen. Deshalb wurden die Parentalstämme reziprok zu F1-Hybriden verkreuzt. Da bis zur Durchführung dieses Versuchs keine Arbeiten veröffentlicht worden waren, die sich mit der Auswirkung einer Kreuzung auf das Merkmal MPTP-Anfälligkeit beschäftigen, war in dieser Etappe die Frage von besonderem Interesse, wie der Phänotyp der F1 im Vergleich zur Parentalgeneration ausfallen würde.

4.3.2 Durchführung

Versuchstiere waren Männchen und Weibchen der reziproken F1-Hybriden B6BCF1 (n=40) und BCB6F1 (n=40). Je die Hälfte der Tiere beider Kreuzungen und Geschlechter wurde mit MPTP behandelt, die andere Hälfte erhielt eine Kontrollbehandlung mit dem Vehikel Kochsalzlösung. Der Versuchsablauf entsprach in sämtlichen Prozeduren der Untersuchung der Parentalgeneration, mit zwei Ausnahmen: Zusätzlich zu Neostriatum und ventralem Striatum wurde der rostrale Pol des Frontalkortex entnommen und dieses Gewebe ebenfalls der neurochemischen Untersuchung auf Monoamine unterzogen. Beim Greif-Test wurde die Untersuchung nicht mehr an vier, sondern nur an den ersten beiden Versuchstagen vorgenommen.

4.3.3 Ergebnisse

4.3.3.1 Verhalten

In unseren unsystematischen Beobachtungen der Tiere war ein deutlicher Unterschied zur Parentalgeneration zu bemerken; die meisten der dort eingangs geschilderten Akutsymptome, also Speichelfluß, veränderte Körperhaltung etc., traten bei den MPTP-behandelten F1-Mäusen gar nicht auf oder waren augenscheinlich weniger ausgeprägt als bei den Parentaltieren.

Offenfeld

Die Kontrollgruppen der beiden Stämme wiesen über die vier Testtage hinweg ein recht konstantes Lokomotionsniveau auf (Abb. 25). In den MPTP-behandelten Gruppen war an Tag 1 die Lokomotionsleistung deutlich niedriger als bei den Kontrollen, lag aber numerisch etwas höher als bei den MPTP-behandelten Tieren der Parentalgeneration (vgl. Abb. 14). Bereits an Tag 2 war die Leistung der MPTP-Gruppen nicht mehr verschieden von den jeweiligen Kontrollen.

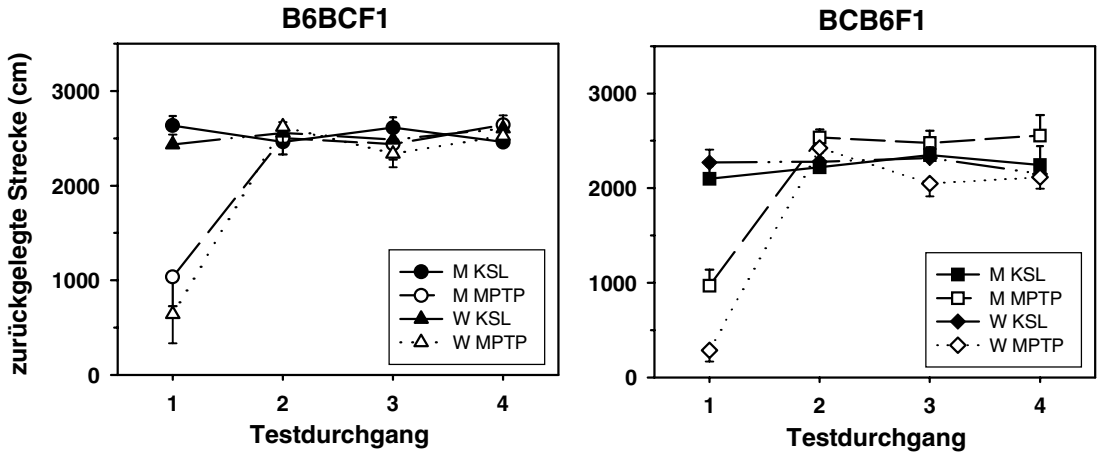

Abb. 25. Zurückgelegte Strecke im Offenfeld (in cm; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Maustämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=80). Die Testdauer betrug 10 Minuten; die erste Messung erfolgte 1 Stunde nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Aus den Rohdaten wurde wieder der lineare Trend berechnet (Tabelle 11), und diese Koeffizienten wurden dann mittels ANOVA (Faktoren: Stamm, Geschlecht, Behandlung) ausgewertet. MPTP-behandelte Tiere hatten dabei signifikant höhere Steigungskennwerte als Kontrolltiere (Haupteffekt "Behandlung": $F_{1,72}=18.74$, $p<0.0001$). Die p-Werte der anderen Faktoren lagen über 0.20.

Tabelle 11. Linearer Trend (Mittelwerte und Standardfehler) der zurückgelegten Strecke im Offenfeld von Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF1				BCB6F1			
	Männchen		Weibchen		Männchen		Weibchen	
	KSL (n=10)	MPTP (n=10)	KSL (n=10)	MPTP (n=10)	KSL (n=10)	MPTP (n=10)	KSL (n=10)	MPTP (n=10)
$a_{1(\text{zurückgelegte Strecke})}$	-3.0 ±43.0	182.7 ±57.0	18.6 ±39.6	141.3 ±53.8	31.9 ±40.8	157.1 ±55.4	-34.1 ±37.0	83.9 ±24.2

Die Gesamtdauer von Aufrichtungen sank ebenfalls unter akuter Wirkung von MPTP stark ab (Abb. 26). Bei den Männchen war ab Tag 2 Kontrollniveau erreicht, bei den MPTP-Weibchen lagen an den weiteren Tagen z.T. noch deutlich niedrigere Werte vor als bei deren Kontrollen. Insgesamt ist bei den Kontrollen eine Tendenz zur Zunahme der Aktivität zu erkennen.

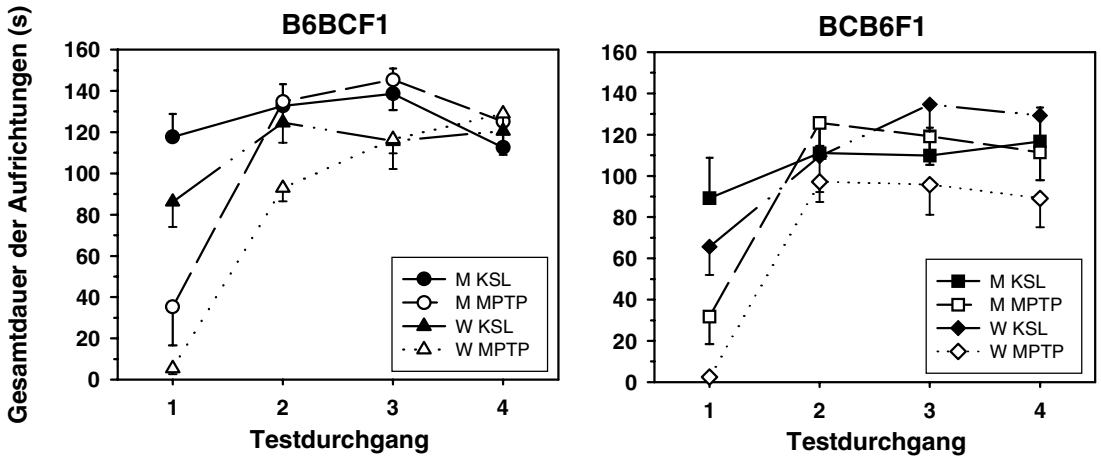

Abb. 26. Gesamtdauer der Aufrichtungen im Offenfeld (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=80). Die Testdauer betrug 10 Minuten; die erste Messung erfolgte 1 Stunde nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Die Defäkation zeigte einen generellen Trend der Zunahme bei wiederholter Testung. Direkt nach MPTP-Behandlung (Tag 1) war die Defäkation deutlich reduziert, erreichte an den folgenden Tagen jedoch Kontrollniveau. Generell schien die Defäkation bei B6BCF1 etwas stär-

ker zu sein als bei BCB6F1 sowie bei Männchen etwas stärker als bei Weibchen (Anhang, Tabelle A-6).

Nestbau

Die Auswertung des Nestbaus erfolgte mittels Kontingenztafeltests. Wie schon in der Parentalgeneration, wurden auch hier die Daten beider Geschlechter für die statistische Auswertung gepoolt. Sämtliche Kontrolltiere hatten bereits nach einem Tag mit dem Nestbau begonnen (Tabelle 12). Beim Vergleich von Kontroll- und Experimentalgruppen mittels Kontingenztafeltest - getrennt nach Kreuzung - betrugen die p-Werte für B6BCF1 p=0.0471 und für BCB6F1 p=0.4872. Für den Vergleich der MPTP-behandelten Gruppen beider Stämme ergab sich p=0.4075. Insgesamt läßt sich aus diesem Ergebnismuster kein klarer MPTP-bedingter Anstieg der Nestbaulatenz ablesen.

Tabelle 12. Nestbauverhalten von Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF1				**BCB6F1**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
Nestbaubeginn	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**
nach 1 Tag	100%	60%	100%	90%	100%	100%	100%	80%
nach 2 Tagen	0%	40%	0%	10%	0%	0%	0%	20%

Angegeben sind absolute Häufigkeiten des Nestbaubeginns. Die Zeitangaben sind bezogen auf den Tag der Behandlung.

Greif-Test

Erneut wurde der prozentuale Anteil der Tiere pro Versuchgruppe bestimmt, die die Plattform erreicht hatten; Testwerte wurden jedoch nur an den ersten beiden Versuchstagen erhoben (Abb. 27). Hier ist zu bemerken, daß sich das Leistungsniveau generell zwischen den beiden Kreuzungen nicht bedeutsam unterschied. Allerdings war bei den F1-Kreuzungen der Leistungsunterschied zwischen MPTP-Bedingung und Kontrollbedingung (KSL) geringer als bei den Parentaltieren, und bei BCB6F1-Männchen erreichten sogar mehr MPTP- als Kontrolltiere die Plattform. In allen MPTP-behandelten Gruppen erhöhte sich der Prozentsatz von Tieren mit erreichtem Kriterium, ein Trend, der bei KSL-behandelten Tieren geringer ausgeprägt war.

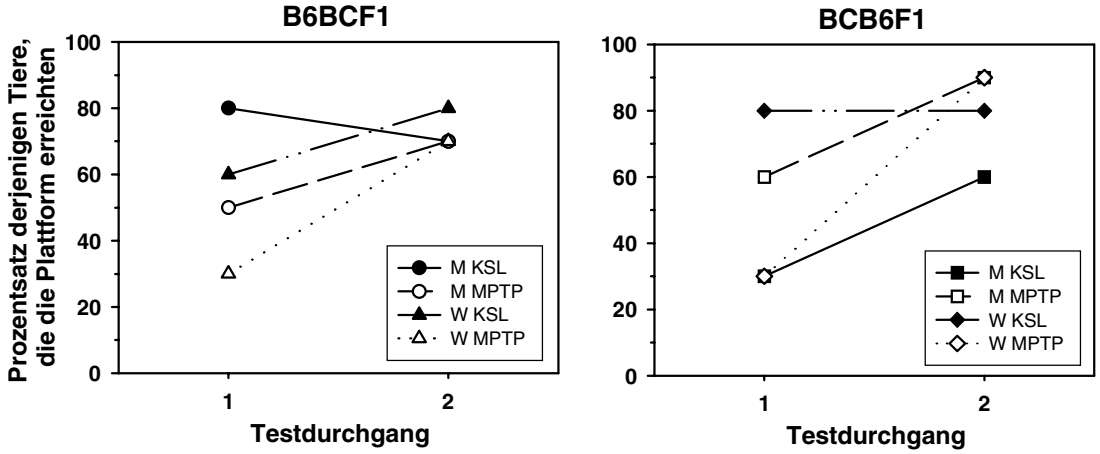

Abb. 27. Greif-Test: relative Häufigkeiten des Kriterium "Plattform vollständig betreten". Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=80). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 2 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Rotarod

Bei allen getesteten Gruppen war die Tendenz erkennbar, daß die verbrachte Zeit auf der drehenden Walze mit wiederholter Testung zunahm. MPTP minderte die Leistung am ersten Tag deutlich in den Weibchen beider Stämme gegenüber ihren Kontrollen, die bereits auf einem hohen Niveau begannen (Abb. 28).

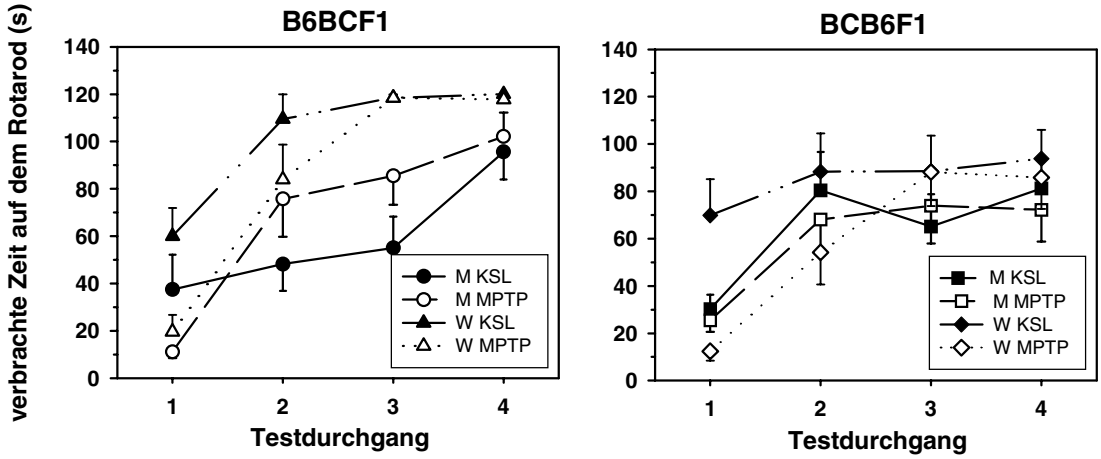

Abb. 28. Rotarod: Verbrachte Zeit auf der rotierenden Walze (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=80). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 2.5 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Ab Tag 3 lagen die MPTP-Weibchen auf Kontrollniveau. Dagegen starteten kontrollbehandelte Männchen bei der ersten Testung auf einem niedrigeren Niveau; bei BCB6F1 waren kaum Unterschiede zur MPTP-Gruppe vorhanden, und MPTP-behandelte B6BCF1-Tiere hatten teilweise sogar höhere Mittelwerte als deren Kontrollen.

Pole-Test

Insgesamt waren die Mittelwerte der Aufenthaltszeiten im Stamm BCB6F1 höher als bei B6BCF1. Im Stamm B6BCF1 nahmen die mittleren Aufenthaltszeiten von Tag 1 nach Tag 2 ab, danach wieder leicht zu; die Mittelwerte der MPTP-Gruppen lagen hier etwas höher als die der Kontrollen. Bei BCB6F1 kam es zu einem Anstieg der Zeiten mit wiederholter Testung; in diesem Stamm verweilten Männchen im Schnitt länger auf der Stange, wobei deren Kontrollgruppe ab Tag 2 höhere Aufenthaltszeiten hatte als die MPTP-Gruppe, während bei den Weibchen die MPTP-Gruppe insgesamt länger auf der Stange war (Abb. 29). Der Prozentsatz von Tieren, die den Stab während der 2-minütigen Testdauer verließen, nahm insbesondere bei BCB6F1 von Tag 1 nach Tag 4 ab (Anhang, Tabelle A-7). Zusatzauswertungen ergaben ferner, daß die Anzahl der 180°-Drehungen auf der Stange in allen Gruppen zunahm und in einigen Gruppen hohe Mittelwerte erreichte (Anhang, Tabelle A-8).

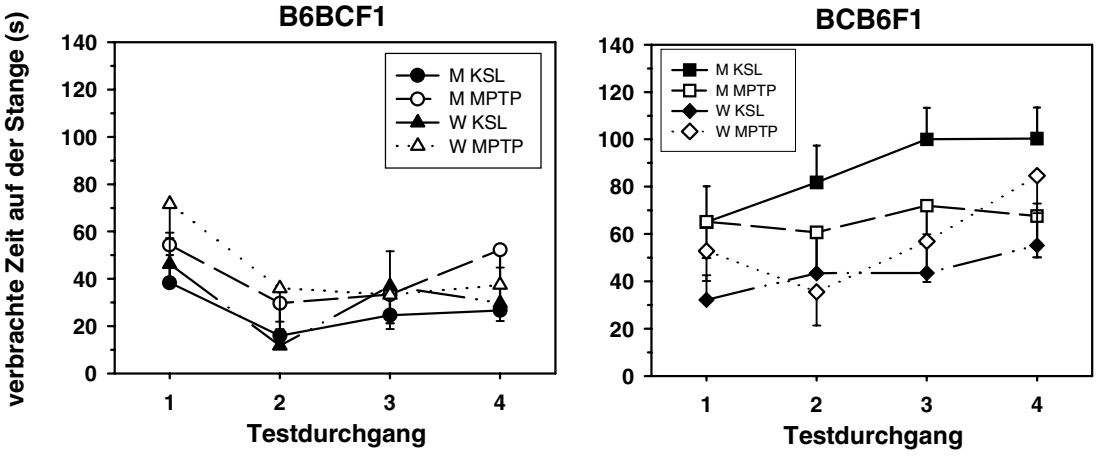

Abb. 29. Pole-Test: Auf der Stange verbrachte Zeit bis zum vollständigen Betreten des Bodens (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=80). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 3 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Elevated Plus-Maze

Bei BCB6F1-Tieren gab es bezüglich der Offenarmzeiten nur minimale Unterschiede zwischen den Geschlechtern und Behandlungsgruppen bei insgesamt relativ niedrigen Zeiten. Im Vergleich dazu gingen B6BCF1-Tiere insgesamt länger auf die offenen Arme; in diesem Stamm schienen MPTP-behandelte Tiere länger als Kontrolltiere und Männchen etwas länger als Weibchen auf den offenen Armen zu verweilen. Für beide Stämme gilt, daß die Zeiten in den einzelnen Gruppen bei den beiden Testungen relativ konstant blieben (Abb. 30).

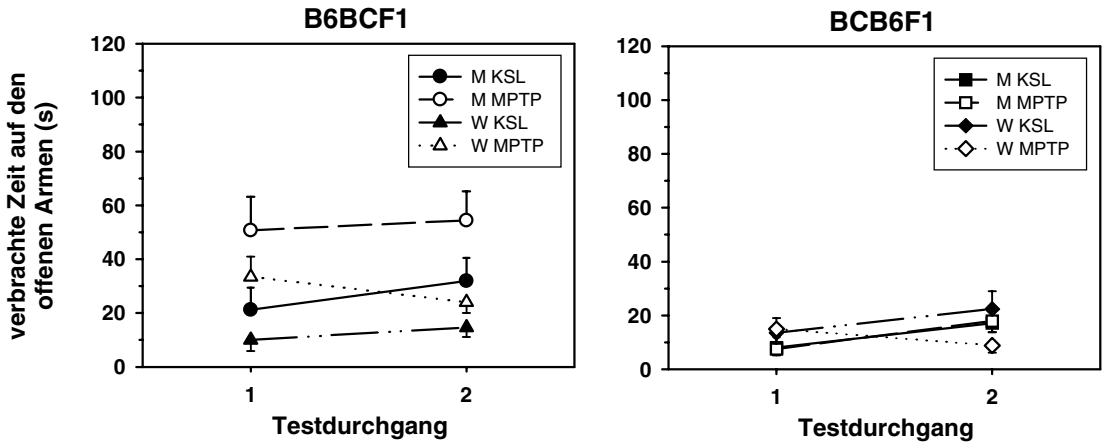

Abb. 30. Aufenthaltszeiten auf den offenen Armen des Elevated Plus-Maze (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=80). Die Testdauer betrug 5 Minuten. Die erste Testung erfolgte 2 Tage nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

4.3.3.2 Neurochemie

Neostriatum (Abb. 31)

Eine ANOVA für den Dopamingehalt im Neostriatum mit den Faktoren "Behandlung", "Stamm" und "Geschlecht" ergab einen signifikanten Behandlungseffekt in Richtung niedrigerer Konzentrationen bei MPTP-Gabe ($F_{1,71}$=34.05, p<0.0001). Die entsprechenden DA-Depletionen betrugen ca. 47% für B6BCF1 und 32% für BCB6F1. Für das Transmitterverhältnis HVA/DA wiesen folgende Faktoren p-Werte unter 0.10 auf: Faktor "Behandlung" ($F_{1,70}$=30.28, p<0.0001), Faktor "Stamm" ($F_{1,70}$=5.47, p=0.0222), Interaktion "Stamm" x "Behandlung" ($F_{1,70}$=4.27, p=0.0425). Eine nachfolgende *post hoc*-Testung deutete klar auf ein höheres Metabolit-Transmitterverhältnis nach MPTP- als nach Kontrollbehandlung

(p=0.0001) bei B6BCF1, aber höchstens ansatzweise bei BCB6F1 (p=0.0805). Keine Hinweise gab es für einen Unterschied zwischen den Kontrollgruppen beider Stämme (p=0.9974). Für den Transmitter NA lagen - mit Ausnahme der Interaktion "Stamm" x "Geschlecht" ($F_{1,71}$=3.04, p=0.0856) alle p-Werte über 0.10.

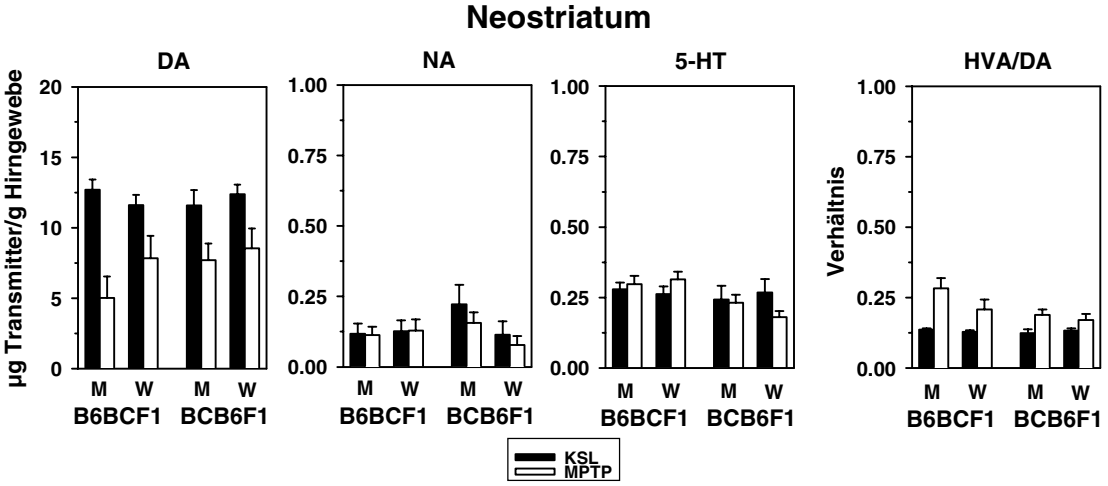

Abb. 31. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im Neostriatum. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP4x15 (weiße Balken) erhalten hatten (n=79).

Beim Transmitter 5-HT ergaben sich p-Werte von p=0.0182 für den Faktor "Stamm" ($F_{1,71}$=5.84) und von p=0.0796 für die Interaktion "Stamm" x "Behandlung" ($F_{1,71}$=3.16).
Da ein Vergleich der MPTP-Anfälligkeit zwischen der F1- und der Parentalgeneration von besonderem Interesse war, wurde exemplarisch ein Generationen-Vergleich anhand der Dopamindepletionen durchgeführt. Da zwischen den F1-Kreuzungen keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung von MPTP auf die neostriatalen DA-Konzentrationen gefunden worden waren, wurden die beiden Kreuzungen gepoolt und deren DA-Depletion als F1-Gesamtgeneration varianzanalytisch mit den beiden sich unterscheidenden Parentalstämmen C57BL/6 und BALB/c verglichen. Diese Analyse deutete an, daß die F1-Generation als Ganzes eine Depletion aufwies, die mit einem Mittelwert von 40% sogar niedriger lag als die des resistenten BALB/c-Stammes mit 59% und des anfälligen C57BL/6-Stamm mit 85% (ANOVA mit Faktor "Stamm" (F1, C57BL/6, BALB/c), $F_{2,85}$=20.08, p<0.0001; *post hoc* F1 vs. BALB/c: p=0.022; *post hoc* F1 vs. C57BL/6: p<0.001).

Ein Vergleich statistischer Kennwerte der neostriatalen DA-Depletionen zwischen F1- und Parentalgeneration förderte außerdem zutage, daß sowohl die Standardfehler als auch die standardisierten Streuungen (Variationskoeffizienten) in den Gruppen der F1-Generation höher lagen als in denen der Parentalgeneration (siehe Tabelle 16 in Abschnitt 4.4.3.2). Dieser Effekt trat jedoch in anderen als neurochemischen Maßen nicht auf (Daten nicht gezeigt). Der Variationskoeffizient ist der Quotient aus Standardabweichung und zugehörigem Mittelwert. Diese Normalisierung dient der Vergleichbarmachung von Streuungen aus Stichproben mit verschieden hohen Mittelwerten und wird üblicherweise in der Verhaltensgenetik zum Vergleich zwischen Generationen verwendet [20].

ventrales Striatum (Abb. 32)

Im ventralen Striatum lieferte die Analyse hinsichtlich Dopamin einen p-Wert von 0.0001 für den Behandlungseffekt ($F_{1,71}$=16.50) in Richtung geringerer Konzentrationen nach MPTP und von p=0.0175 für den Stammeffekt im Sinne höherer Werte bei BCB6F1 ($F_{1,71}$=5.91). Die DA-Depletionen lagen bei 32% (B6BCF1) und 22% (BCB6F1). Keine p-Werte unter 0.10 ergaben die ANOVAs für das Transmitterverhältnis HVA/DA und die Konzentrationen von NA. Bei 5-HT ergab sich p=0.0656 im Faktor "Stamm" ($F_{1,71}$=3.50).

.

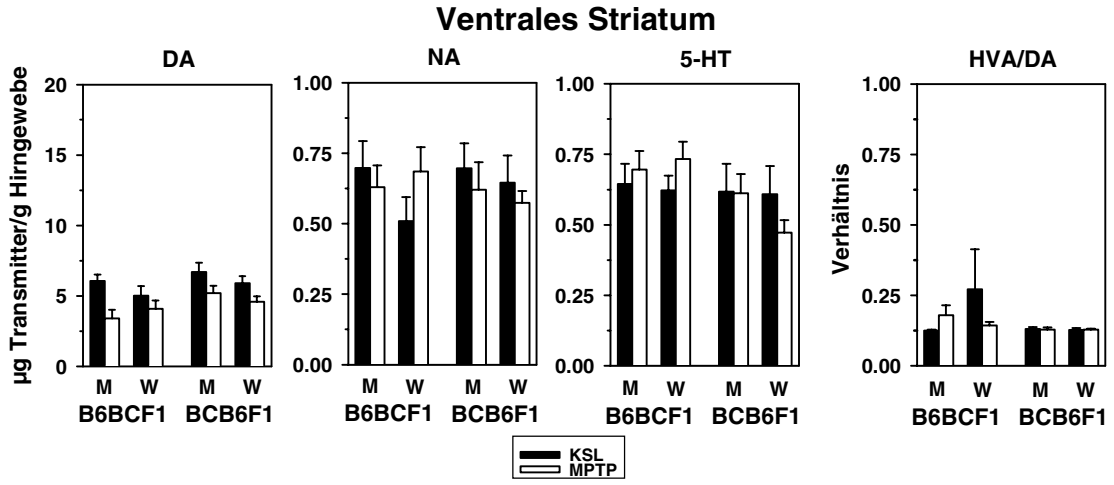

Abb. 32. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im ventralen Striatum. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP4x15 (weiße Balken) erhalten hatten (n=79).

Frontalkortex (Abb. 33)

Im Frontalkortex ergaben sich in der ANOVA hinsichtlich des Transmitters DA für den Behandlungseffekt p=0.0750 ($F_{1,58}$=3.29) und hinsichtlich des HVA/DA-Verhältnisses p=0.0366 für die Interaktion "Stamm" x "Geschlecht" ($F_{1,58}$=4.58). Kein *post hoc*-Vergleich erreichte einen p-Wert unter 0.10. Bei Noradrenalin wies der Behandlungseffekt ($F_{1,58}$=5.41, p=0.0234) auf einen Konzentrationsrückgang nach MPTP, bei 5-HT lag der Stammeffekt bei p=0.0042 in Richtung höherer Konzentrationen bei B6BCF1 ($F_{1,59}$=8.90).

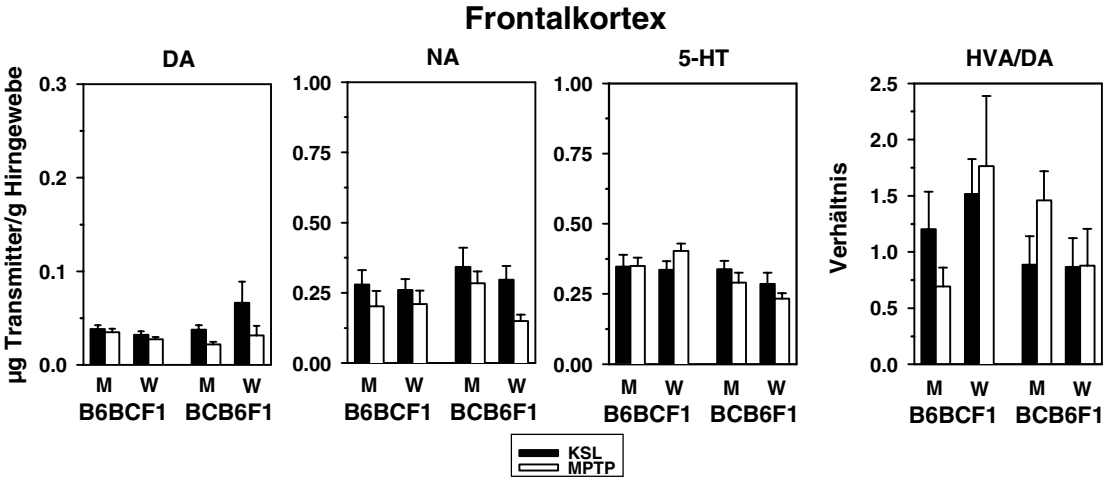

Abb. 33. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im Frontalkortex. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP4x15 (weiße Balken) erhalten hatten (n=67).

4.3.3.3 Histologie

Die Auswertung der Zellzahlen (Tabelle 13) mittels ANOVA deutete auf insgesamt tendenziell höhere Zellzahlen in der SN bei Männchen als bei Weibchen hin (Faktor "Geschlecht", $F_{1,70}$=3.51, p=0.0651), ein Effekt, der bei Betrachtung der Zellzahlen hauptsächlich auf die Kreuzung B6BCF1 zurückgehen dürfte. Alle übrigen p-Werte lagen über 0.10.

Bei der Analyse der Daten der VTA wies die Interaktion "Stamm" x "Behandlung" einen p-Wert von p=0.0649 auf ($F_{1,70}$=3.52), während die p-Werte aller anderen Faktoren über 0.20 lagen.

Beim Vergleich zwischen den Generationen fällt auf, daß die Mittelwerte der Zellzahlen der Kontrolltiere in der F1 numerisch höher waren als in der Parentalgeneration.

Tabelle 13. Mittlere Anzahlen TH-positiver Zellen in Substantia nigra (SN) und Area tegmentalis ventralis (VTA) von Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF1				**BCB6F1**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=10)	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=9)**	**KSL (n=9)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**
SN	335.9 ±12.0	317.5 ±14.6	300.0 ±22.4	266.3 ±15.6	289.7 ±18.3	298.3 ±14.7	289.1 ±21.5	293.3 ±17.8
VTA	186.5 ±14.3	158.5 ±7.4	165.8 ±7.7	155.9 ±9.2	155.4 ±8.5	172.2 ±8.1	165.1 ±10.5	163.8 ±12.1

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der durchschnittlichen Zellzahlen pro Hirnschnitt.

4.3.3.4 Letalität

In der F1-Generation ist kein Tier an den Folgen der MPTP-Toxizität gestorben, die Mortalität betrug also für jede Gruppe 0%.

4.3.3.5 Körpergewicht

Das Körpergewicht blieb bei allen B6BCF1-Gruppen nahezu konstant, während es bei BCB6F1 sowohl nach Kontroll- als auch nach MPTP-Behandlung vorübergehend um ca. 1 Gramm niedriger lag. Die Weibchen waren jeweils deutlich leichter als die Männchen (Anhang, Tabelle A-9).

4.3.4 Diskussion

Ziel dieses Experiments war es, Informationen über Auswirkungen einer Behandlung mit MPTP in den reziproken F1-Kreuzungen zweier Stämme, die bezüglich ihrer MPTP-Suszeptibilität als unterschiedlich charakterisiert worden waren, zu gewinnen. Hierzu wurde - mit minimalen Änderungen - dasselbe Methodenarsenal von Verhaltenstests sowie von neurochemischen und histologischen Untersuchungen zentraler DAerger Systeme angewendet wie in der Parentalgeneration.

Unser grober Eindruck, der auf nicht standardisierten Beobachtungen beruhte, war der, daß die F1-Tiere weitaus geringere akute Reaktionen auf eine MPTP-Behandlung aufzuweisen

schienen als das in beiden Stämmen der Parentalgeneration der Fall gewesen war. Etliche Ergebnisse der standardisiert durchgeführten Verhaltenstests wiesen in dieselbe Richtung. Im Offenfeld blieb die lokomotorische Aktivität der Kontrollen über 4 Tage hinweg relativ konstant. In den MPTP-behandelten Gruppen war die Aktivität an Tag 1 deutlich geringer als bei den Kontrollen, ab Tag 2 jedoch wieder auf deren Niveau. Dieses Muster spiegelte sich auch im linearen Trend der Kurven wider, welcher in der MPTP-Bedingungen moderat höher lag als in den Kontrollgruppen; Stammunterschiede lagen dabei nicht vor. Dieser rasche Erholungsverlauf ähnelt dem des BALB/c-Stamms, also dem weniger MPTP-anfälligen Stamm der Elterngeneration. Beim Aufrichtverhalten waren die Defizite bei Männchen ebenfalls auf Tag 1 begrenzt; bei Weibchen bot sich ein weniger klares Bild, da auch bei Kontrollen über die Testungen hinweg die Aufrichtdauer zunahm, was die Interpretation erschwert. Berücksichtigt man außerdem, daß insbesondere die B6BCF1-Weibchen eine geringere neostriatale Depletion aufwiesen, andererseits aber auch eine geringere Aktivität beim Aufrichten als die Männchen, ist zu bezweifeln, daß dieses Maß zuverlässig den Grad der neuralen Schädigung widerspiegelt.

Eine akut unterdrückende Wirkung von MPTP auf die Defäkation im Offenfeld mit Erholung an den nachfolgenden Tagen war auch in der F1-Generation erkennbar. In anderen Verhaltenstests waren meßbare Folgen der MPTP-Behandlung äußerst gering: Der Beginn des Nestbaus erschien allenfalls in der Teilkreuzung B6BCF1 minimal verzögert, und beim Plus-Maze lagen die Offenarmzeiten in dieser Kreuzung nach MPTP- ansatzweise höher als nach Kontrollbehandlung. Im Greif-Test, dem Rotarod und dem Pole-Test waren klare MPTP-bedingte motorische Defizite jedoch so gut wie nicht erkennbar. Im Pole-Test war bereits bei vielen Kontrolltieren einerseits zwar die Fähigkeit zur Fortbewegung und zu Drehungen auf der Stange, aber gleichzeitig die fehlende Tendenz zu beobachten, die Stange zu verlassen, wie es bereits in den BALB/c-Tieren gefunden worden war. Dies steht dem Prinzip des Testverfahrens entgegen [317], was eine Interpretation in Hinblick auf MPTP-bedingte Defizite massiv erschwert. Da die Haltungs- und Testbedingungen der F1-Tiere so gut wie machbar mit denen der Parentaltiere übereinstimmten, kann spekuliert werden, ob Faktoren, die zu dieser Tendenz beitragen, über Allele im BALB/c-Genom vererbt werden. Erstaunlicherweise war jedoch die mangelnde Bereitschaft zum Verlassen der Stange in einer Kreuzung (BCB6F1) wesentlich deutlicher zu beobachten; würde sich dies in einer vorzunehmenden Replikation mit statistischer Auswertung bestätigen, deutete das auf einen geschlechtsgebundenen Vererbungsweg hin.

Mit den geringen MPTP-bedingten Verhaltensdefiziten korrespondierten die Ergebnisse auf der neuralen Betrachtungsebene: Zwar zeigte sich erneut die neurotoxische Wirkung von MPTP darin, daß in allen MPTP-behandelten Gruppen die DA-Konzentrationen niedriger waren als in den entsprechenden Kontrollgruppen; die Depletionen lagen in der F1-Generation jedoch insgesamt noch niedriger als im resistenten Parentalstamm BALB/c. Die beiden F1-Kreuzungen unterschieden sich im neostriatalen Dopamingehalt zwar nicht signifikant, aber es war eine Tendenz für eine etwas höhere DA-Depletion in B6BCF1 zu erkennen (bedingt vor allem durch die hier wiederum anfälligeren Männchen). Auch die Tatsache, daß sich eine kompensatorische Erhöhung des DA-Stoffwechsels nur bei B6BCF1-Tieren abzeichnete, deutet in dieselbe Richtung. Wie schon bei den Parentaltieren lag der DA-Verlust im ventralen Striatum noch unter dem im Neostriatum. Um weitere Anhaltspunkte über das regionale Wirkprofil von MPTP zu bekommen, wurde in der F1-Generation zusätzlich zu den beiden striatalen Strukturen auch der rostrale Pol des Frontalkortex auf seinen Monoamingehalt untersucht. Es zeigten sich nach MPTP keine klaren dopaminergen Veränderungen, aber eine leichte Konzentrationsminderung des Katecholamins Noradrenalin; eine solche Konstellation ist auch in einer anderen Arbeit bei C57BL/6-Tieren gefunden worden [297]. In Übereinstimmung mit den sehr mäßig ausgeprägten neurochemischen Defiziten gab es auf der zellulären Betrachtungsebene keine Hinweise auf Verlust von TH-immunoreaktiven Zellen infolge der MPTP-Behandlung. Schließlich trat in F1-Tieren keine Letalität, die eine mögliche periphere Wirkung von MPTP darstellt, auf. Dies würde auf Gemeinsamkeiten in der neurotoxischen und der letalen Wirkung von MPTP hinweisen, wie von Hamre et al. [184] vermutet. Unsere Ergebnisse aus der Parentalgeneration stützen dies hingegen weniger, denn hier trat auch im Stamm BALB/c, der gegen die Neurotoxizität von MPTP resistenter war als C57BL/6, in mehreren Tieren Letalität ein.

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse so zusammenfassen, daß die neurotoxische Wirkung von MPTP in der F1-Generation relativ gering ausfällt. In den meisten Parametern reagierten die Tiere der beiden F1-Kreuzungen etwa wie der wenig MPTP-anfällige Stamm BALB/c der Parentalgeneration; gemessen am striatalen Dopaminverlust lag die Anfälligkeit der F1-Generation als Ganzes sogar deutlich unter demjenigen bei BALB/c. Die Beobachtung, daß der Ausprägungsgrad polygen vermittelter Eigenschaften in F1-Kreuzungen denjenigen ihrer Ausgangsstämme im Sinne biologischer Fitness übertrifft, wird häufig gemacht, z.B. in Form höherer Lebensdauer, Entwicklungsgeschwindigkeit, nachgeburtlicher Überlebensrate oder Anzahl von Neuronen in bestimmten Hirngebieten [91,201,264]. Man bezeichnet dieses Phä-

nomen in der englischsprachigen Literatur als "hybrid vigor". Interessant ist ein Vergleich des von uns gefundenen "hybrid vigor", d.h. der höheren MPTP-Resistenz in der F1-Generation als im resistenteren der beiden Elternstämme, mit den Ergebnissen der Studie von Hamre et al. [184], die nach Abschluß unseres Experiments publiziert worden ist. In jener Arbeit wurde die Anfälligkeit für MPTP in mehreren Maus-Inzuchtstämmen anhand des Zellverlustes in der SN quantifiziert, und die Stämme, die bei diesem Vergleich die oberen und unteren Extremwerte bildeten (C57BL/6 vs. Swiss-Webster und AKR/J), wurden zur F1-Generation verkreuzt. Die F1-Kreuzungen erwiesen sich dabei als vergleichbar anfällig wie der anfälligste Ausgangsstamm C57BL/6. Dieses wesentliche Ergebnis der Hamre-Studie ist damit in gewisser Weise konträr zu dem von uns festgestellten Sachverhalt. Einschränkend ist zu sagen, daß erstens der zweite Stamm dort ein anderer als BALB/c war, zweitens zwar das gleiche Dosierungs*schema,* aber eine höhere MPTP-Dosis als bei uns verwendet und drittens dort nur der Parameter "nigraler Zellverlust" ermittelt worden war. Anhand unserer Daten ist es nicht möglich zu entscheiden, ob der SN-Zellverlust in der F1 auch geringer als in der Parentalgeneration ausgefallen wäre, da bei unserer MPTP-Dosis ein Bodeneffekt eingetreten ist (sprich: kein Zellverlust bereits im resistenteren Stamm der Parentalgeneration), oder ob der Hybrid-Vigor auf den striatalen DA-Verlust beschränkt ist. Dennoch dürften die genannten Unterschiede zwischen beiden Studien letztendlich kaum für die prinzipiell *gegensätzlichen* Ergebnisse kritisch sein.

Die hohe Anfälligkeit der F1-Generation bei Hamre et al. wurde unter der Annahme erklärt, daß C57BL/6 ein Suszeptibilitätsallel trage, welches *dominant* vererbt wird. Diese Erklärung eignet sich hingegen nicht für das Ergebnismuster unserer Studie. Unsere Ergebnisse lassen sich besser begreiflich machen, wenn man von einem *rezessiven* Suszeptibilitätsallel bei C57BL/6 ausgeht. Vorausgesetzt, daß der gegenüber BALB/c geringere DA-Verlust in der F1 tatsächlich substantiell ist, genügt selbst die Annahme eines solchen Suszeptibilitätslocus alleine noch nicht. Der Effekt ließe sich aber einsichtig machen, wenn man zusätzlich eine Interaktion von Genloci annimmt. Das Zusammentreffen von Allelen aus C57BL/6 und BALB/c könnte so in einer sehr geringen Suszeptibilität resultieren. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß beim Vergleich von Stämmen die meßbare Tatsache einer geringeren Schädigung durch eine gegebene Neurotoxinmenge grundsätzlich durch zwei verschiedenartige Mechanismen zustande kommen kann: Wie die Beispiele in Abschnitt 1.4.6 belegen, kann entweder die Abwesenheit oder die Anwesenheit bestimmter Faktoren zu erhöhter MPTP-Anfälligkeit führen. Anders ausgedrückt können Gene den Charakter von Suszeptibilitäts- oder Resistenzgenen haben. Es ist durchaus plausibel, daß ein Zusammenspiel beider

Typen letztlich für den Phänotyp "MPTP-Anfälligkeit" verantwortlich ist. Als weiterer Faktor soll noch erwähnt werden, daß Gene nicht nur in der Art eines Alles-oder-Nichts-Prinzips (dominant/rezessiv) zusammenwirken können, sondern auch kodominant agieren können, d.h. daß das Zusammentreffen verschiedener Allele zu einer phänotypischen Mischform führen kann. Unwahrscheinlich ist, daß alle die Loci, die bei unserem Vergleich von C57BL/6 und BALB/c relevant sind, mit denen in der Hamre-Studie übereinstimmen, denn solch ein hypothethischer Locus bei C57BL/6 müßte einerseits dominant gegenüber SWR und AKR sein und andererseits rezessiv gegenüber BALB/c. Aus dieser Sicht stellen die gegensätzlichen Ergebnisse der beiden Studien auch nicht zwingend einen Widerspruch dar, sondern können vielmehr als ein weiteres Indiz für die Beteiligung *mehrerer* Gene an der Steuerung der MPTP-Anfälligkeit angesehen werden.

Ebenfalls in die Richtung eines Einflusses mehrerer Gene könnte die Tatsache deuten, daß wir für neurochemische Parameter wie den striatalen DA-Gehalt in der F1-Generation in den MPTP-behandelten Gruppen eine höhere Variabilität als in der Parentalgeneration gefunden haben, erkennbar sowohl im Variationskoeffizienten als auch im Standardfehler der Mittelwerte. Da eine F1-Population genetisch homogen ist, ist eine solche Konstellation untypisch [326], wurde aber als Tryon-Effekt beschrieben [195]. Dieses Phänomen ist bislang unzureichend verstanden worden, wird aber als deutliches Anzeichen der polygenen Natur einer solchen Eigenschaft interpretiert. Da bei Verhaltens- oder histologischen Daten jedoch kein solcher Trend erkennbar war, muß alternativ auch in Betracht gezogen werden, daß die Schwankungen methodisch bedingt sein könnten. Während der Untersuchung der F1-Generation trat eine starke Verschmutzung der HPLC-Anlage auf, die deren Sensitivität innerhalb kurzer Zeit massiv verringerte. Als Gegenmaßnahmen wurden die Anlage gespült sowie die Säule und die mobile Phase ausgetauscht. Danach wurde die Analyse der F1-Gewebeproben fortgesetzt, bereits analysierte Proben aber nicht wieder prozessiert, da ein erneutes Auftauen der tiefgekühlt gelagerten Proben deren Transmittergehalt möglicherweise unkontrolliert verändert hätte. Zur Kontrolle wurden die Kalibrierungsfaktoren, die für jeden Transmitter anhand der Standardlösung an jedem Meßtag vor der eigentlichen Analyse ermittelt wurden, über die gesamte Zeitspanne unseres Projektes verglichen. Dabei zeigte sich für den besonders wichtigen Transmitter Dopamin eine bemerkenswerte Konstanz. Es kann daher angenommen werden, daß die beschriebenen Reinigungsmaßnahmen nicht substantiell zu den Schwankungen beigetragen haben. Auch die Tatsache, daß die Variationskoeffizienten in den F1-Kontrollgruppen, deren Gewebeproben zur gleichen Zeit wie diejenigen der MPTP-Gruppen analysiert wurden, nicht

höher liegen als in der Parentalgeneration, spricht gegen eine Fehlerquelle in der HPLC-Analytik. Ein weiterer methodischer Kritikpunkt betrifft die Frage der Konstanz der Injektionsbehandlung. Denkbar wäre, daß in der F1-Studie die Injektion regelmäßig an einem anatomisch anderen Ort als in den Tieren der Parentalgeneration vorgenommen worden ist, bedingt z.B. durch die andere Fellfarbe oder das im Mittel etwas höhere Körpergewicht in der F1. Eine solche systematische Variation könnte dann dazu führen, daß die neurotoxisch zur Wirkung kommende MPTP-Menge etwas geringer ausfiele und damit geringere Läsionen zur Folge hätte. Dieser Einwand kann nicht völlig entkräftet werden; allerdings sind uns - im Bewußtsein einer solchen potentiellen Fehlerquelle - keine nennenswerten anatomischen Unterschiede aufgefallen, und geringe Abweichungen würden vermutlich auch durch die Tatsache kompensiert werden, daß MPTP sehr gut wasserlöslich ist und daher leicht durch Gewebe diffundieren sollte. Als eine Maßnahme, die wir zum Zwecke einer möglichst gleichartigen Behandlung getroffen hatten, sei hier auch erwähnt, daß die Injektionen der Tiere von der Parental- bis zur F2-Generation immer von derselben Experimentatorin (Frau Dr. Hofele) durchgeführt worden sind.

Beim zentralen Ergebnis unserer F1-Studie, der relativ hohen MPTP-Resistenz, stellt sich die Frage nach den dahinterliegenden physiologischen Mechanismen. Da die Ergebnisse jedoch keinen Aufschluß über die beteiligten Gene geben können, bleibt diese Frage weiterhin spekulativ. Interessanterweise fallen die mittleren Zellzahlen in der Substantia nigra der F1-Kreuzungen numerisch etwas höher aus als bei den Ausgangsstämmen; diese Sachlage könnte als Anhaltspunkt für die in der Vergangenheit mehrfach angestellte Vermutung dienen, wonach hohe Ausgangszellzahlen prognostisch günstig sind [307,350]. Gegen diese Erklärung spricht jedoch, daß bei der bereits mehrfach erwähnten Arbeit von Hamre et al. [184] die SN in der F1-Generation im Mittel ebenfalls mehr Zellen als in den Parentalstämmen aufwies, was dort jedoch von einer *höheren* Anfälligkeit begleitet war.

Abschließend ist festzuhalten, daß die für dieses Experiment vorgenommene genetische Manipulation, nämlich die Kreuzung zweier Inzuchtstämme, einen regelhaften Einfluß auf den von uns untersuchten Phänotyp "MPTP-Suszeptibilität" hatte. Die Annahme, daß die Anfälligkeit für das Neurotoxin MPTP genetisch beeinflußt ist, wurde dadurch weiter erhärtet. Die Ergebnisse legen nahe, daß mehr als ein Gen für den Phänotyp verantwortlich zeichnet. Vorgeschlagen wurde, daß im BALB/c-Genom Allele vorliegen, die Resistenz bewirken, und im C57BL/6-Genom Allele vorliegen, die Anfälligkeit begünstigen. Derartige Faktoren könnten

im Sinne einer genetischen Interaktion zu einer erhöhten Resistenz in der F1-Generation führen. Es spricht also einiges dafür, daß die von uns untersuchte Eigenschaft einer polygenen Steuerung unterliegt. Dies ist wiederum eine gute Ausgangsbasis, um die Suche nach dahinterliegenden genetischen Mechanismen QTL-analytisch anzugehen. Die Frage, ob es Unterschiede zwischen den beiden reziproken Kreuzungen hinsichtlich der MPTP-Anfälligkeit gibt, konnte anhand der Ergebnisse dagegen nicht eindeutig beantwortet werden. Zwar wiesen einzelne Maße (Nestbau, neostriataler DA-Umsatz) in die Richtung einer etwas höheren Anfälligkeit bei B6BCF1, in anderen Maßen war dies jedoch nicht deutlich erkennbar.
Der logisch folgende Schritt ist die Produktion und Phänotypisierung einer F2-Generation. Dies wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.4 F2-Generation

4.4.1 Einleitung

Ein besonders wichtiger Schritt im Rahmen eines QTL-Mapping-Projekts ist die Phänotypisierung der F2-Generation. Deren phänotypische Daten bilden die Grundlage für eine spätere Suche nach solchen chromosomalen Abschnitten, die mit dem Phänotyp in Verbindung stehen, also den QTL. Daneben sollte in der F2-Generation als eine weitere bedeutsame Fragestellung überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Pigmentierung der Tiere und ihrer MPTP-Anfälligkeit besteht. Ausgehend von den Ergebnissen früherer Stammvergleiche ist wiederholt vermutet worden, daß das Fehlen von Pigmentierung die MPTP-Anfälligkeit reduziert [124,200]; mit dieser Vermutung konform sind etliche der in Tabelle 2 aufgelisteten Stammvergleichsstudien, in denen Albinostämme geringere Läsionseffekte aufwiesen als pigmentierte Stämme. Albinismus wird verursacht durch das Fehlen des Pigmentfarbstoffs Melanin. Die ersten beiden Schritte der Melanin-Synthese aus Tyrosin werden durch das Enzym Tyrosinase katalysiert, das im Mausgenom auf Chromosom 7 durch das Gen *Tyr* enkodiert wird. Mutationen in diesem Gen können bewirken, daß kein funktionsfähiges Enzym gebildet wird, was zu Albinismus führt [467]. Der Befund einer verringerten MPTP-Suszeptibilität bei Albino-Mäusen in Stammvergleichsstudien deutet prinzipiell auf eine Beteiligung dieses Genlocus am Phänotyp hin. Jedoch kann dies bei der geringen Zahl untersuchter Stämme natürlich eine zufällige Konstellation sein, denn da die verschiedenen Stämme sich in etlichen Loci unterscheiden, kann der Effekt auch auf andere Gene zurückgehen, deren resultierender Phänotyp nicht offen sichtbar ist. Fände man dagegen bei einer großen Zahl von genetisch heterogenen Tiere, wie sie in einer F2-Generation vorkommen, daß Albinotiere von der MPTP-Wirkung weniger stark betroffen sind, stellte dies eine deutlich stärkere Evidenz dar. Hier kann angenommen werden, daß die Allele anderer Gene rein zufällig in Albinos und pigmentierten Tieren verteilt sind und sich, wenn man man große Gruppen betrachtet, in ihren Wirkungen "herausmitteln" (jedoch mit der Ausnahme von Genen, die auf dem gleichen Chromosom wie *Tyr* lokalisiert sind).

In der F2-Generation einer Kreuzung von C57BL/6 und BALB/c regeln 3 verschiedene Gene die Hauptcharakteristika der Fellpigmentierung, nämlich die Farbfaktoren A,B,C:

A agouti	vs.	**a** non-agouti, d.h. nicht-wildfarben
B schwarz	vs.	**b** braun
C non-albino	vs.	**c** albino, d.h. die phänotypische Ausprägung der Faktoren A und B ist unterdrückt)

Die mit Großbuchstaben bezeichneten Allele sind dominant, die mit Kleinbuchstaben bezeichneten rezessiv. Der Parentalstamm C57BL/6 trägt die Allele aaBBCC (Phänotyp: schwarz), der Stamm BALB/c AAbbcc (Phänotyp: albino). In der F1-Generation hatten alle Tiere den Genotyp AaBbCc mit dem resultierenden Phänotyp agouti (wildfarben, d.h. die Pigmentierung ist ungleichmäßig). Wie in Abb. 4 angedeutet, führen die möglichen Kombinationen der Allele in der F2 zu fünf gut unterscheidbaren Fellfärbungen in unterschiedlicher Auftretenshäufigkeit: schwarz, braun, agouti, zimtfarben, albino. Wir beschränkten uns jedoch auf einen Vergleich aller pigmentierten Tiere (schwarz, braun, agouti, zimtfarben) mit den Albinotieren hinsichtlich ihrer MPTP-Anfälligkeit. Weitere Details zur Genetik der Fellfärbung finden sich bei Köhler [234].

Neben der Bedeutung der Pigmentierung interessierten wir uns auch für periphere Wirkungen von MPTP, die eventuell an Phänomenen wie der Letalität nach MPTP-Gabe beteiligt sind. Da als eine mögliche Ursache der Letalität allgemeines Herz-Lungen-Versagen in Frage kommt [184], wurde bei einigen B6BCF2-Tieren exemplarisch eine Analyse des Gehalts der Monoamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin im Herz durchgeführt.

4.4.2 Durchführung

Versuchstiere waren Männchen und Weibchen der reziproken F2-Kreuzungen B6BCF2 (n=201) und BCB6F2 (n=225); die Kreuzung B6BCF2 wurde durch Verpaarung von B6BCF1-Tieren gewonnen, die Kreuzung BCB6F2 durch Verpaarung von BCB6F1-Tieren. Je 12 der Tiere beider F2-Kreuzungen und Geschlechter erhielten eine Behandlung mit dem Vehikel Kochsalzlösung (KSL), alle übrigen wurden mit MPTP4x15 behandelt. Der Versuchsablauf entsprach in sämtlichen Prozeduren der Untersuchung der F1-Generation; zusätzlich wurde die Fellfärbung aller Tiere protokolliert und auch fotografisch dokumentiert. Außerdem wurde bei einem Teil der Tiere der kaudale Pol des Herzen entnommen und dieses Gewebe ebenfalls einer neurochemischen Untersuchung auf Monoamine unterzogen. Der Standard, mit dem die HPLC-Anlage vor der Untersuchung dieser Herzgewebe-Proben geeicht wurde, enthielt neben den in 3.5.2 aufgeführten Monoaminen auch 50 ng Adrenalin/ml. Dadurch war zusätzlich eine Quantifizierung des Adrenalingehaltes möglich.

4.4.3 Ergebnisse

4.4.3.1 Verhalten

Offenfeld

MPTP führte in beiden Stämmen und Geschlechtern zu einer Abnahme der Lokomotion an Tag 1; ab Tag 2 lagen die Mittelwerte der MPTP-behandelten Gruppen auf Kontrollniveau, teilweise sogar leicht darüber (Abb. 34). Für die Verlaufskurven der Offenfelddaten wurde erneut deren linearer Trend berechnet (Tabelle 14) und varianzanalytisch ausgewertet. Signifikant wurden dabei die Faktoren "Geschlecht" ($F_{1,345}$=4.23, p=0.0405) mit höheren Steigungswerten bei Männchen sowie "Behandlung" ($F_{1,345}$=53.09, p<0.0001) mit höheren Werten in der MPTP-Bedingung.

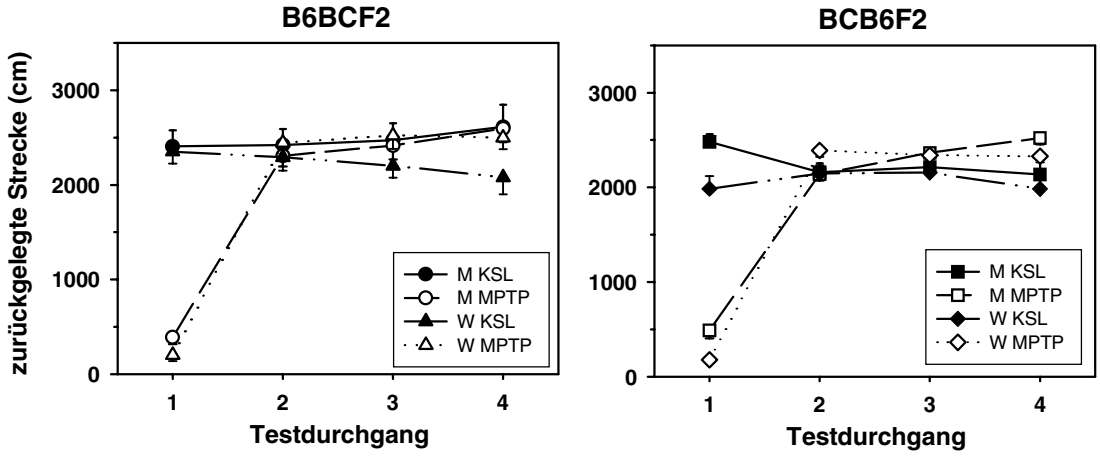

Abb. 34. Zurückgelegte Strecke im Offenfeld (in cm; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=353). Die Testdauer betrug 10 Minuten; die erste Messung erfolgte 1 Stunde nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Hinsichtlich der Gesamtdauer der Aufrichtungen war für die Mittelwerte der Kontrollgruppen ein leichter Anstieg von Tag 1 nach Tag 2 zu verzeichnen, gefolgt von einem Abfall an den folgenden Testzeitzeitpunkten (Abb. 35). In den MPTP-behandelten Gruppen war am Tag der Behandlung nahezu keine Aufrichtaktivität festzustellen; an den folgenden Tagen kam es zu

einer Erholung dieser Aktivität, teilweise sogar zu einem Anstieg über das Kontrollniveau hinaus.

Tabelle 14. Linearer Trend (Mittelwerte und Standardfehler) der zurückgelegten Strecke im Offenfeld bei Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF2				**BCB6F2**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=12)	**MPTP (n=83)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=65)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=93)**	**KSL (n=11)**	**MPTP (n=67)**
$a_{1(\text{zurückgelegte Strecke})}$	63.2 ±40.3	290.2 ±31.7	-78.7 ±45.4	248.3 ±28.2	-11.4 ±62.8	296.5 ±23.8	-27.5 ±65.9	191.3 ±22.0

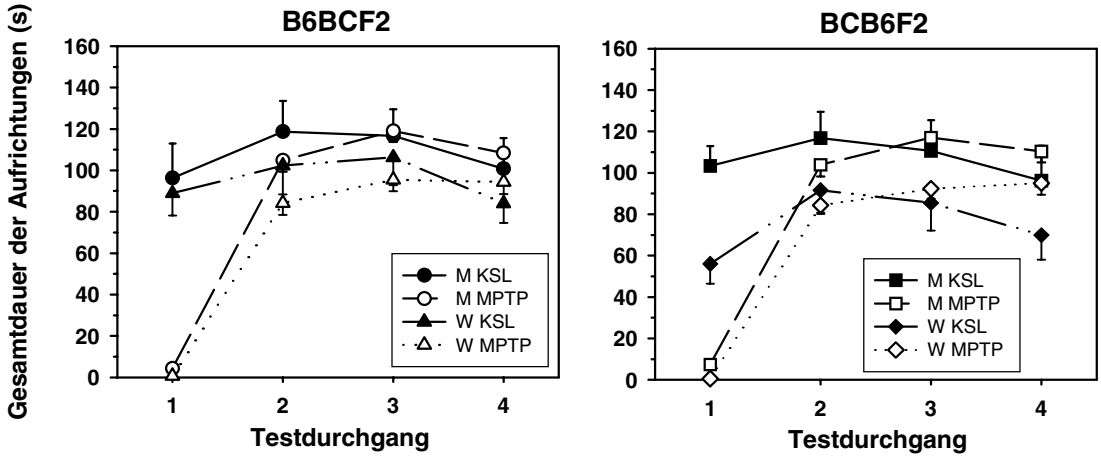

Abb. 35. Gesamtdauer der Aufrichtungen im Offenfeld (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=363). Die Testdauer betrug 10 Minuten; die erste Messung erfolgte 1 Stunde nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Die Defäkation wies ein ähnliches Muster auf wie bereits in der Parental- und F1-Generation: Die mittlere Anzahl der Boli stieg über die vier Testzeitpunkte hinweg an, und in den MPTP-Gruppen war am ersten Tag praktisch eine vollständige Unterdrückung der Defäkation zu beobachten und ein Erreichen der Durchschnittswerte der Kontrollen an den folgenden Tagen. Männchen schienen eine etwas höhere Defäkation aufzuweisen als Weibchen; nennenswerte Stammunterschiede zeichneten sich nicht ab (Anhang, Tabelle A-10).

Nestbau

Für die Auswertung des Nestbaus wurden wiederum die Daten beider Geschlechter für die statistische Auswertung zusammengeführt. Mit Ausnahme eines einzigen Tieres hatten alle Kontrolltiere bereits nach einem Tag mit dem Nestbau begonnen (Tabelle 15). Beim Vergleich von Kontroll- und Experimentalgruppen - getrennt nach Kreuzung - mittels Kontingenztafeltest betrugen die p-Werte für B6BCF2 p=0.0142 und für BCB6F2 p=0.2688. Zwar könnte der p-Wert für B6BCF2 - anders als für BCB6F2 - im Sinne einer Erhöhung der Nestbaulatenz gedeutet werden, in absoluten Zahlen sind die Unterschiede zwischen den MPTP-Gruppen aber sehr gering, so daß eine vorsichtige Interpretation angezeigt ist.

Tabelle 15. Nestbauverhalten von Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF2				**BCB6F2**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
Nestbaubeginn	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=84)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=65)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=97)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=69)**
nach 1 Tag	100%	88%	100%	69%	92%	89%	100%	81%
nach 2 Tagen	0%	11%	0%	29%	8%	10%	0%	19%
nach 3 Tagen	0%	0%	0%	2%	0%	1%	0%	0%
nach 4 Tagen	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Angegeben sind relative Häufigkeiten des Nestbaubeginns in Prozent der jeweiligen Gruppengröße. Die Zeitangaben sind bezogen auf den Tag der Behandlung.

Zudem ergab sich für den Vergleich der MPTP-behandelten Gruppen beider Stämme p=0.1815. Insgesamt läßt sich aus diesem Muster allenfalls ein sehr moderater Anstieg der Nestbaulatenz in einem Teil der F2-Generation ablesen.

Greif-Test

Der prozentuale Anteil der Tiere pro Versuchgruppe, die die Plattform erreichten, unterschied sich zwischen beiden Kreuzungen nicht bedeutsam (Abb. 36). An Tag 1 erfüllte in den MPTP-Gruppen jeweils ein geringerer Anteil von Tieren das Kriterium als in den Kontrollgruppen. Im Vergleich dazu war in allen Gruppen mit MPTP-Behandlung zum zweiten Testtag ein deutlicher Anstieg zu erkennen, so daß dann kein wesentlicher Unterschied zu den Kontrollgruppen mehr bestand.

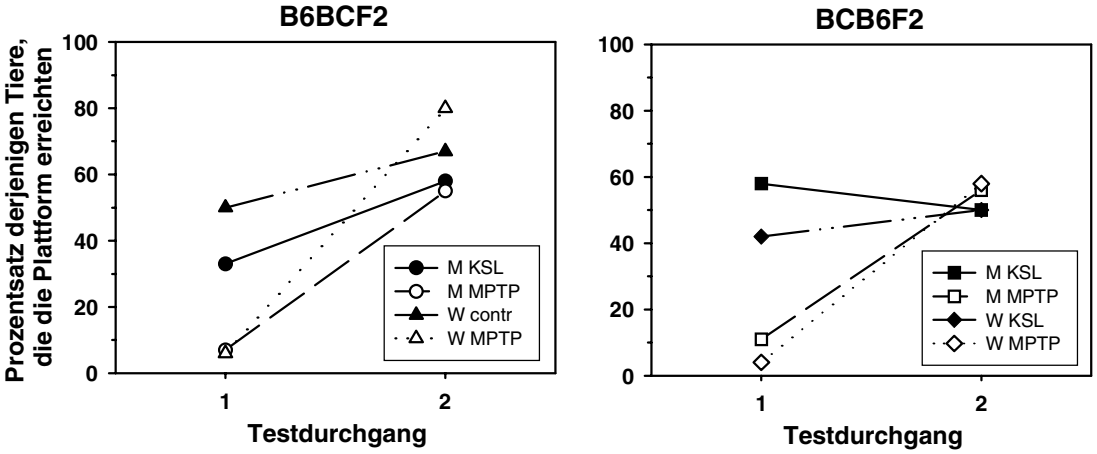

Abb. 36. Greif-Test: relative Häufigkeiten des Kriterium "Plattform vollständig betreten". Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=363). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 2 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Rotarod

In allen getesteten Gruppen war im Mittel ein Anstieg der Zeit, die auf der rotierenden Walze verbracht wurde, erkennbar.

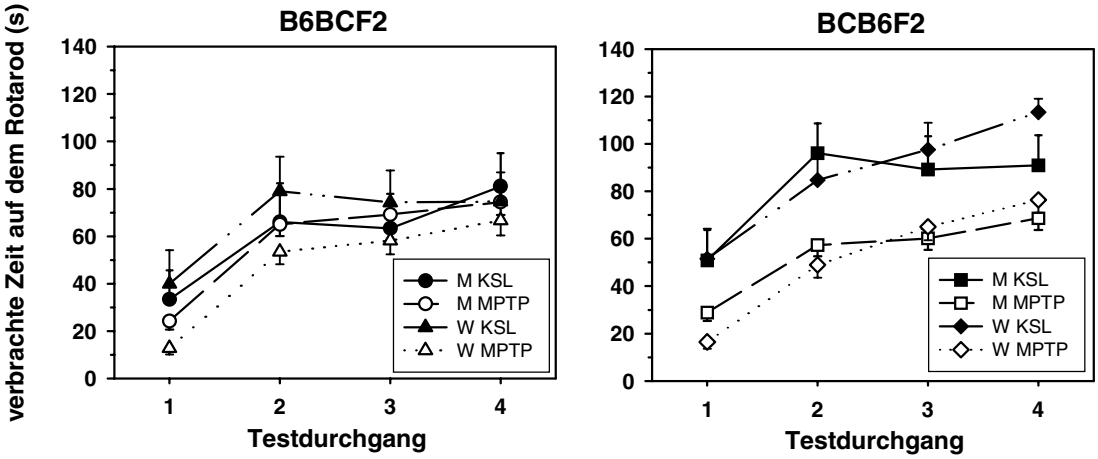

Abb. 37. Rotarod: Verbrachte Zeit auf der rotierenden Walze (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=363). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 2.5 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Während MPTP-behandelte B6BCF2-Männchen allenfalls am ersten Tag etwas schlechter waren als die Kontrollen, erreichten die Weibchen erst an Tag 4 Kontrollniveau. Bei BCB6F2-Tieren war nach MPTP-Behandlung das Niveau an allen Tagen niedriger als nach Kontrollbehandlung (Abb. 37).

Pole-Test

Am Tag der Behandlung (Tag 1) lagen die Mittelwerte für die auf der Stange verbrachte Zeit in den MPTP-Gruppen numerisch etwas höher als in den Kontrollgruppen, spätestens ab Tag 3 jedoch darunter. Dies ergab sich daraus, daß die Zeiten in der MPTP-Bedingung im Mittel abnahmen, während in 3 der 4 Kontrollgruppen über die Testungen hinweg ein leichter Anstieg auftrat (Abb. 38). Ein teilweise beträchtlicher Anteil der Kontrollen (bis zu 50%) betrat den Boden nicht (Anhang, Tabelle A-11). Um abzuschätzen, wie sehr dadurch die Mittelwerte der Aufenthaltszeiten verändert werden, wurden diese erneut berechnet unter Ausschluß aller Tiere, die an Tag 4 die Stange nicht verlassen hatten; hierbei wurde die Annahme gemacht, daß auch die MPTP-behandelten Tiere funktional so weit erholt sein sollten, daß sie die Aufgabe *motorisch* bewältigen könnten. Bei diesen korrigierten Mittelwerten fand sich ein starker Rückgang der Aufenthaltszeiten über die 4 Testzeitpunkte hinweg in allen Gruppen mit Ausnahme der ohnehin konstant niedrigen Zeiten bei männlichen BCB6F2-Kontrollen. Ferner zeigten sich initial schlechtere Leistungen in den MPTP-Gruppen mit Annäherung an das jeweilige Kontrollniveau an den folgenden Tagen (Anhang, Tabelle A-12).

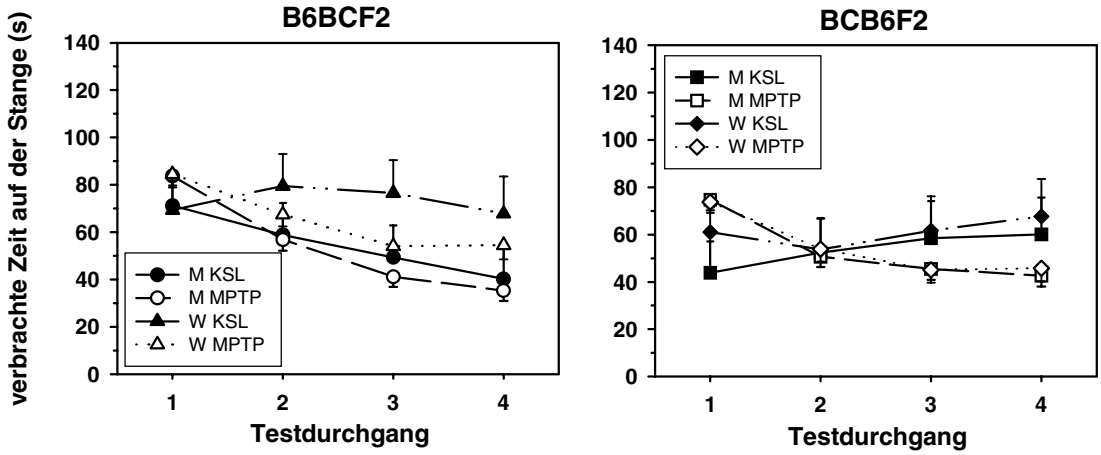

Abb. 38. Pole-Test: Auf der Stange verbrachte Zeit bis zum vollständigen Betreten des Bodens (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=363). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 3 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Elevated Plus-Maze

Die Offenarmaufenthaltszeiten unterschieden sich zwischen den einzelnen Gruppen nur gering; MPTP-behandelte Tiere hatten in einigen Gruppen geringfügig höhere Mittelwerte als Kontrolltiere.

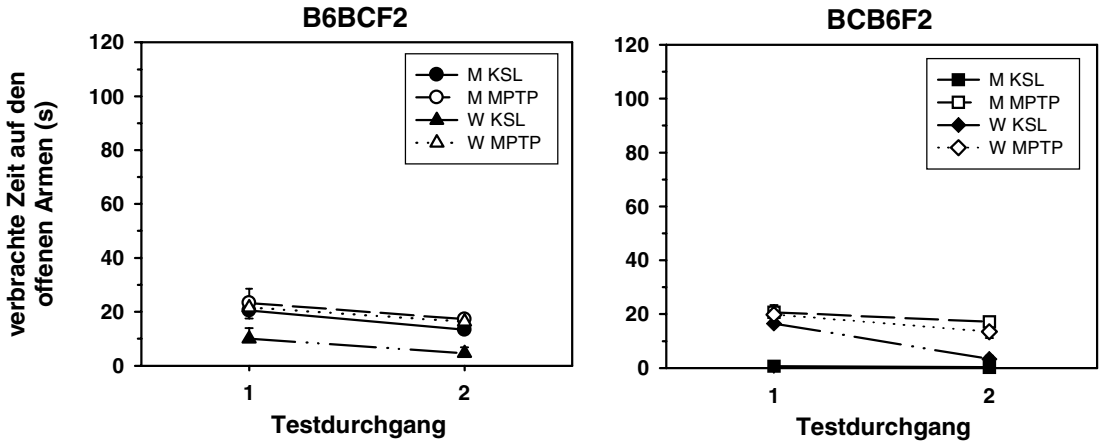

Abb. 39. Aufenthaltszeiten auf den offenen Armen des Elevated Plus-Maze (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen (M) und Weibchen (W) der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=362). Die Testdauer betrug 5 Minuten. Die erste Testung erfolgte 2 Tage nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Eine Abweichung war jedoch bei den männlichen BCB6F2-Kontrollen zu verzeichnen, deren Mittelwert nahe bei Null liegt; tatsächlich haben in dieser Gruppe (n=12) nur zwei Tiere (Testung 1) bzw. ein Tier (Testung 2) überhaupt die Offenarme betreten (Abb. 39).

4.4.3.2 Neurochemie

Neostriatum (Abb. 40)

Für neostriatales DA wurden die ANOVA-Faktoren "Geschlecht" ($F_{1,350}$=38.31, p<0.0001) und "Behandlung" ($F_{1,350}$=167.74, p<0.0001) sowie die Interaktion "Geschlecht" x "Behandlung" ($F_{1,350}$=37.18, p<0.0001) signifikant. Bei einer *post hoc*-Analyse zeigte sich, daß sich die DA-Konzentrationen von Männchen und Weibchen nicht nach Kontrollbehandlung unterschieden (p=1.0000), aber nach MPTP-Behandlung bei Männchen niedriger als bei Weibchen waren (p<0.0001). Die zugehörigen Depletionswerte sind in Tabelle 16 aufgeführt.

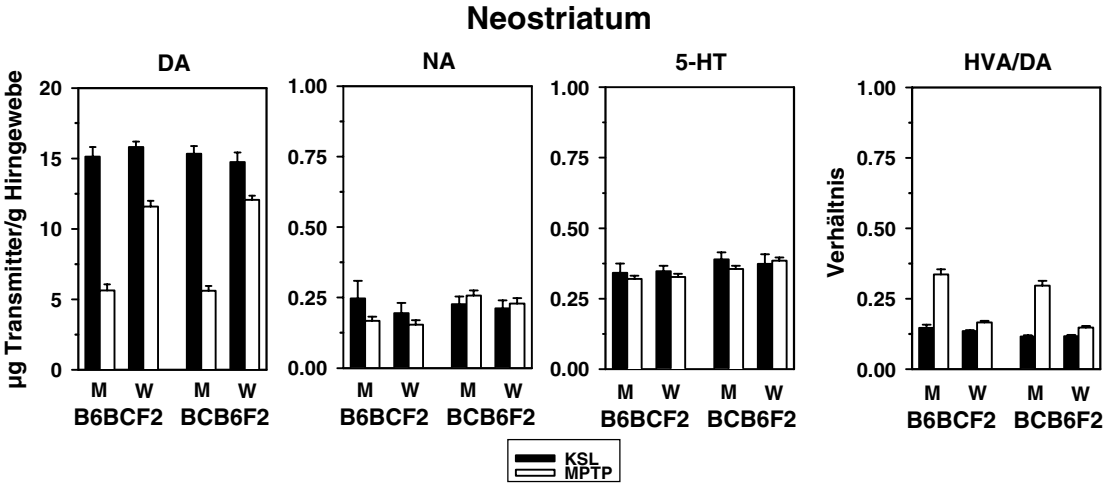

Abb. 40. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im Neostriatum. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP (weiße Balken) erhalten hatten (n=358).

Ein ähnliches Ergebnismuster gilt auch für das Verhältnis HVA/DA: Wiederum wiesen die Faktoren "Geschlecht" ($F_{1,350}$=19.09, p<0.0001) und "Behandlung" ($F_{1,350}$=33.24, p<0.0001) sowie die Interaktion "Geschlecht" x "Behandlung" ($F_{1,350}$=16.96, p<0.0001) sehr niedrige p-Werte auf. Bei einer *post hoc*-Testung betrug der p-Wert beim Vergleich der Kontroll- mit der MPTP-Bedingung bei Männchen p<0.0001 in Sinne höherer Werte in der MPTP-Bedingung, bei Weibchen p=0.6494.
Für NA ergaben sich keine p-Werte unter 0.05, für den Transmitter 5-HT deutete der Haupteffekt "Stamm" ($F_{1,350}$=6.83, p=0.0093) auf insgesamt höhere Konzentrationen in der Kreuzung BCB6F2.

In Tabelle 16 sind synoptisch für die Parental-, F1- und F2-Generation die Mittelwerte, Minima, Maxima, Standardfehler und Variationskoeffizienten der neostriatalen DA-Depletion aufgeführt. Auffällig sind die deutlich höheren Standardfehler in der F1-Generation gegenüber beiden anderen Generationen. Die höchsten Variationskoeffizienten fanden sich ebenfalls in der F1.

Tabelle 16. Übersicht über statistische Kennwerte der neostriatalen DA-Depletion in Männchen (M) und Weibchen (W) der Parental-, F1- und F2-Generation, die eine Behandlung mit MPTP4x15 erhalten hatten.

	C57BL/6		BALB/c		B6BCF1		BCB6F1		B6BCF2		BCB6F2	
	M	**W**	**M**	**W**	**M**	**W**	**M**	**W**	**M**	**W**	**M**	**W**
Mittelwert	82.9	88.4	60.4	57.5	60.5	32.3	33.6	31.0	62.7	26.7	63.4	18.2
n	13	11	13	12	10	9	10	10	82	64	97	68
Minimum	70.2	73.4	9.7	11.1	-12.9	-36.3	-18.7	-37.1	-10.1	-22.0	2.0	-11.2
Maximum	95.4	96.2	82.0	88.4	88.5	86.4	67.8	77.9	94.7	74.3	97.0	78.6
Standardfehler	2.1	2.0	5.8	6.7	12.2	13.7	10.2	11.4	2.8	2.5	2.3	2.1
Variations-koeffizient	0.09	0.07	0.35	0.40	0.64	1.27	0.96	1.16	0.40	0.76	0.36	0.95

Hinweis: Bei einigen Minima liegen negative Werte vor. Dies bedeutet, daß in dieser Gruppe mindestens ein Tier vorhanden war, bei dem trotz MPTP-Behandlung eine neostriatale DA-Konzentration gemessen wurde, die höher als der Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe war.

Die Verteilungen der DA-Depletion (Abb. 41) zeigten neben der unterschiedlichen Lage der zentralen Tendenzen für die beiden Geschlechter auch, daß bei den Männchen eine zweigipflige Kurve vorzuliegen scheint, mit einem ausgeprägten Maximum im Intervall 80-90% und einem kleineren Gipfel bei 20-30%.

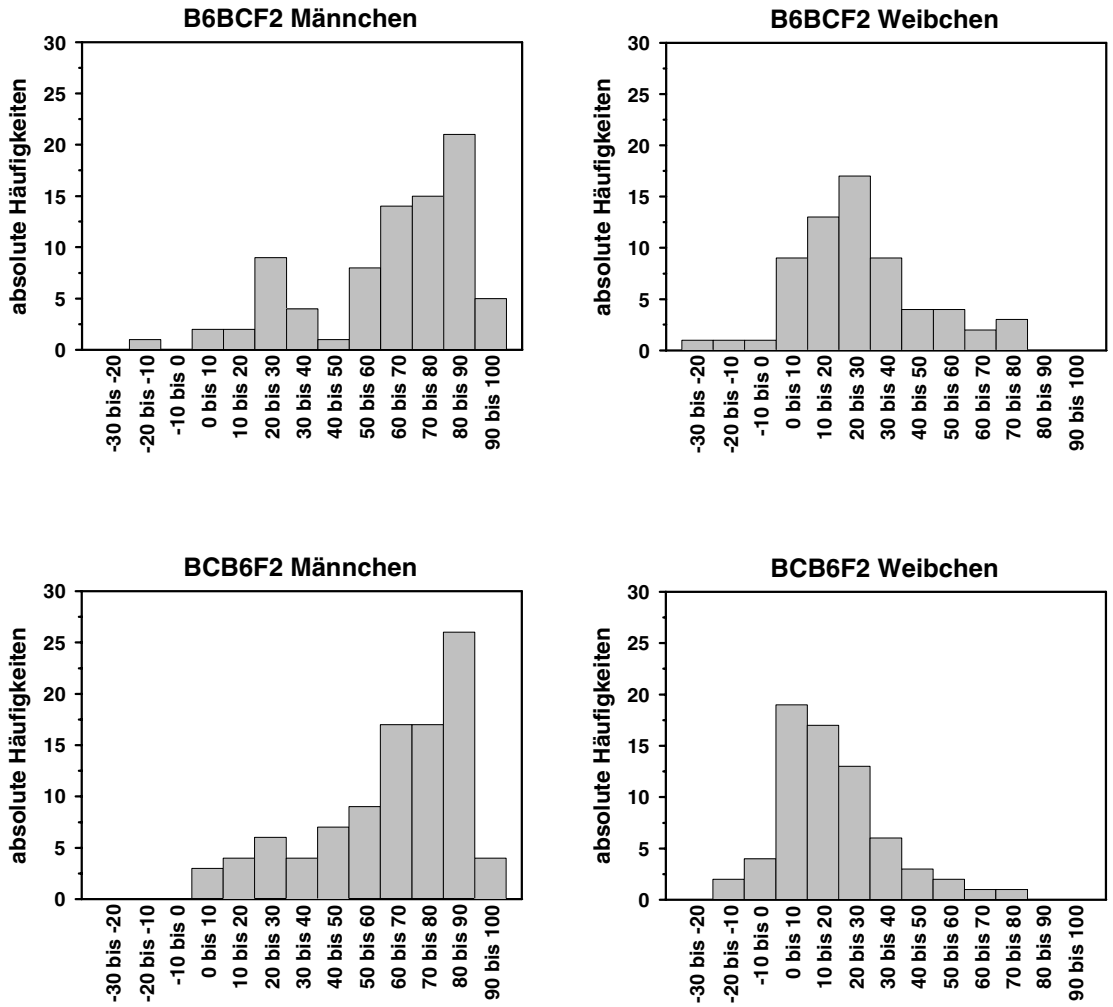

Abb. 41: Verteilungen der neostriatalen DA-Depletionen (in % der jeweiligen Kontrollen). Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten, gruppiert zu Intervallen in 10%-Schritten. Untersucht wurden Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die eine Behandlung mit MPTP4x15 erhalten hatten (n=311).

ventrales Striatum (Abb. 42)

Im ventralen Striatum lauten für den Transmitter DA die Ergebnisse der ANOVA für die Faktoren "Geschlecht" p=0.0360 ($F_{1,351}$=4.43), "Behandlung" p<0.0001 ($F_{1,351}$=44.33) und die Interaktion "Geschlecht" x "Behandlung" p<0.0001 ($F_{1,351}$=24.50). Bei einer *post hoc*-Analyse ergab sich beim Vergleich von Kontroll- und MPTP-Bedingung für die Männchen p<0.0001, für die Weibchen p=0.6297. Die entsprechenden DA-Depletionen betrugen bei B6BCF2 37% (Männchen) bzw. 7% (Weibchen) und bei BCB6F2 40% bzw. 6%. Für das Verhältnis HVA/DA wiesen folgende Faktoren p-Werte kleiner als 0.05 auf: "Stamm" ($F_{1,351}$=9.77, p=0.0019) im Sinne höherer Turnover-Werte bei B6BCF2, "Geschlecht" ($F_{1,351}$=4.84,

p=0.0284) im Sinne höherer Werte bei Männchen und "Behandlung" ($F_{1,351}$=8.43, p=0.0039) mit höheren Werten bei MPTP-Behandlung.

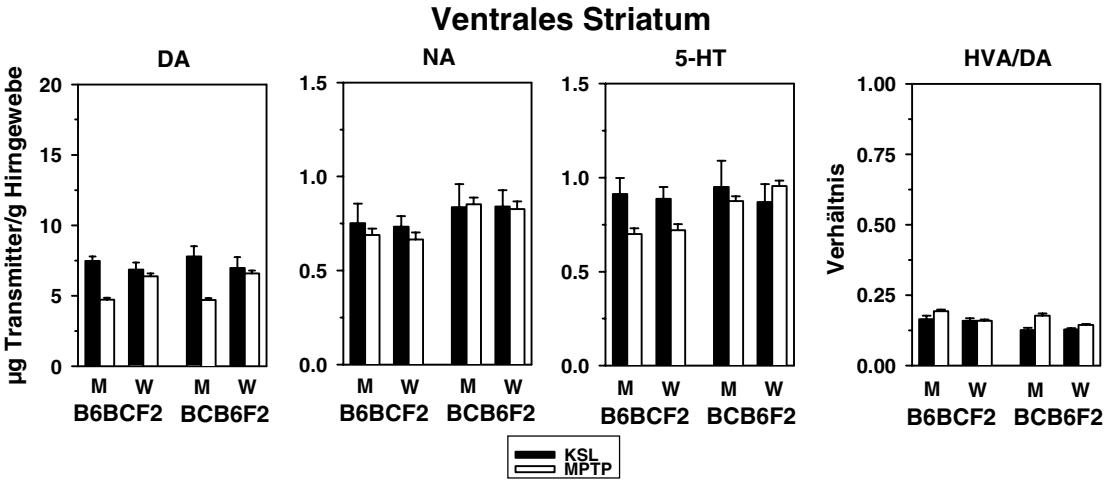

Abb. 42. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im ventralen Striatum. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP (weiße Balken) erhalten hatten (n=359).

Beim Neurotransmitter NA deutete das Ergebnis des Haupteffektes "Stamm" auf höhere Konzentrationen bei B6BCF2 ($F_{1,348}$=6.40, p=0.0119). In der Analyse für Serotonin erreichte der Faktor "Stamm" p=0.0116 ($F_{1,351}$=6.44) in Richtung höherer Werte bei BCB6F2, "Behandlung" p=0.0294 ($F_{1,351}$=4.79) und die Interaktion "Stamm" x "Behandlung" p=0.0216 ($F_{1,351}$=5.33). Bei einem *post hoc*-Vergleich zwischen Kontroll- und MPTP-Behandlung ergab sich bei B6BCF2 p=0.0083 im Sinne einer MPTP-bedingten Konzentrationsminderung, bei BCB6F2 p=0.9998.

Frontalkortex (Abb. 43)

Im Frontalkortex betrug für den Transmitter DA der p-Wert des Haupteffekts "Stamm" p=0.0003 ($F_{1,331}$=13.43) in Richtung höherer Werte bei BCB6F2-Tieren. Für das Verhältnis HVA/DA ergab sich im Haupteffekt "Stamm" p<0.0001 ($F_{1,308}$=16.09) in Richtung höherer Werte bei B6BCF2-Tieren.

Für Noradrenalin deutete ein p-Wert von weniger als 0.0001 für den "Faktor" Behandlung ($F_{1,348}$=33.72) auf einen NA-Verlust nach MPTP-Behandlung hin, für Serotonin beträgt der p-Wert für diesen Faktor p=0.0580 ($F_{1,349}$=3.62).

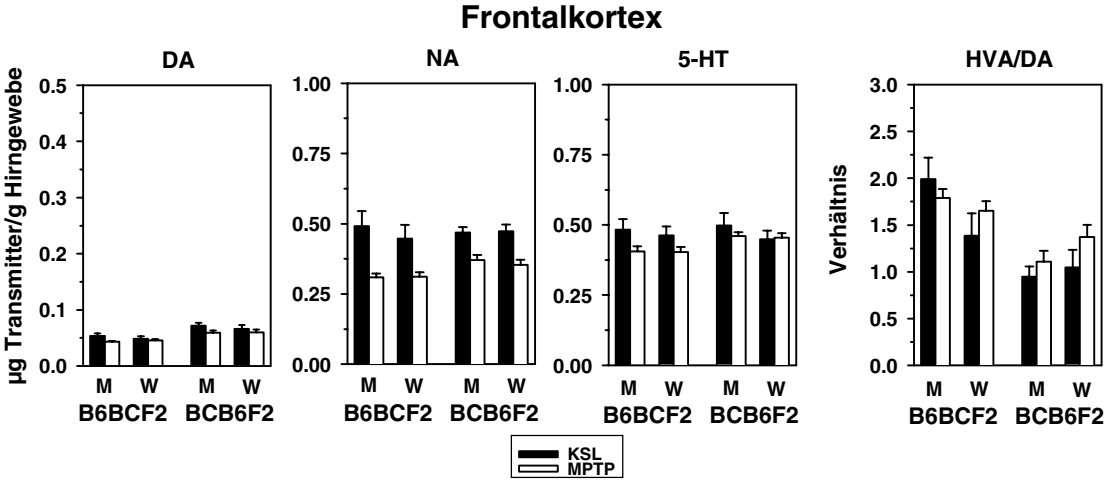

Abb. 43. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im Frontalkortex. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP (weiße Balken) erhalten hatten (n=357).

4.4.3.3 Histologie

In Tabelle 17 sind Zellzahlen in SN und VTA der F2-Generation angegeben. Es handelt sich sämtlich um Daten von Tieren, die mit MPTP4x15 behandelt worden waren. Da die Zellzählung eine besonders zeitintensive Analyse ist, war erst ein kleiner Teil der Hirnschnitte aller F2-Tiere ausgewertet, als diese Arbeit verfaßt wurde. Die gezeigten Daten stellen daher nur eine Teilstichprobe dar, und es lagen zufallsbedingt auch noch keine Daten zu kontrollbehandelten Tieren (KSL) vor, so daß eine Berechnung des mittleren Zellverlustes nicht möglich war. Die zu diesen Tieren zugehörigen DA-Depletionen liegen für B6BCF2 bei 63% (Männchen) und 34% (Weibchen), für BCB6F2 bei 64% und 19%. Die Mittelwerte der Teilstichproben sind somit hinsichtlich dieses wichtigen neurochemischen Parameters repräsentativ für die Gesamtstichprobe (vgl. Tabelle 16).

Mit den vorhandenen Daten aus SN und VTA wurden Varianzanalysen mit den Faktoren "Stamm" und "Geschlecht" durchgeführt; kein Faktor erreichte einen p-Wert unter 0.20.

Setzte man - wohlgemerkt spekulativ - für die F2-Kontrolltiere ähnlich hohe Zellzahlen wie in der F1-Generation voraus (vergleiche Tabelle 13), könnte bei den MPTP-Tieren der F2 allenfalls ein geringer Zellverlust aufgetreten sein.

Tabelle 17. Mittlere Anzahlen TH-positiver Zellen in der Substantia nigra (SN) und in der Area tegmentalis ventralis (VTA) bei Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die eine Behandlung mit MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF2		BCB6F2	
	Männchen (n=12)	Weibchen (n=12)	Männchen (n=26)	Weibchen (n=26)
SN	276.2±23.7	266.9±24.9	296.0±17.8	281.8±16.1
VTA	153.3±11.6	144.8±12.9	150.7±7.3	145.8±6.7

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der durchschnittlichen Zellzahlen pro Hirnschnitt.

4.4.3.4 Letalität, Pathologie und periphere Effekte von MPTP

In Tabelle 18 sind die absoluten Anzahlen der MPTP-behandelten Tiere, die gestorben sind, und die entsprechenden Prozentwerte für diese Gruppen aufgelistet. Die Mehrzahl der Todesfälle trat innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Behandlung ein. In den Kontrollgruppen (KSL-Behandlung) kam es dagegen nicht zu Todesfällen.

Tabelle 18. MPTP-bedingte Letalität von Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die eine Behandlung mit MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF2		BCB6F2	
	Männchen (n=85)	Weibchen (n=92)	Männchen (n=98)	Weibchen (n=103)
Anzahl gestorbener Tiere	1	27	1	34
prozentualer Anteil	1.2%	29.4%	1.0%	33.0%

Hinsichtlich des Todes der beiden F2-Männchen ist zu bemerken, daß eines davon infolge einer unbeabsichtigten Herzpunktion während einer Injektion gestorben ist; bei dem anderen Tier kam es vermutlich während der Injektionsprozedur zu einer unbeabsichtigten Verletzung

der Halswirbelsäule[6]. Die durch die *Substanz* MPTP bedingte Letalität in den männlichen F2-Experimentalgruppen kann also faktisch als nicht vorhanden betrachtet werden. Bei den gestorbenen Weibchen können dagegen auf der Basis unserer Beobachtungen derartige mechanische Einwirkungen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als Todesursache ausgeschlossen werden.
Insgesamt läßt sich festhalten, daß ein deutlicher Geschlechtsunterschied hinsichtlich der toxischen Wirkung von MPTP dahingehend bestand, daß F2-Männchen praktisch nicht betroffen waren, wogegen nahezu ein Drittel der Weibchen beider F2-Kreuzungen an den Folgen der MPTP-Behandlung starb.

Um genauere Informationen über die Todesursache(n) zu erhalten, sind vier gestorbene F2-Weibchen möglichst rasch nach ihrem Tod gekühlt und deren Körper dann mit Formalin fixiert worden. Diese Tiere wurden dann von der Pathologin der TVA, Frau Dr. Brumloop, einer pathologischen Standarduntersuchung unterzogen worden. Dabei wurde in allen vier Tieren als vermutliche Todesursache ein perivaskuläres Ödem (Wasseransammlung im Gewebe um die Blutgefäße herum) in der Lunge festgestellt; ferner wurde festgestellt, daß drei der vier Weibchen sich im Östrus-Stadium ihres Zyklus befunden haben, im vierten Tier war eine eindeutige Diagnose nicht möglich.

Die geschlechtsspezifische Letalität stellt eine Stichprobenselektion dar und könnte die Ergebnisse anderer erhobener Parameter verändern. Für eine grobe Abschätzung dieses potentiellen Effekts wurde für den Parameter DA-Depletion folgende Simulation vorgenommen: Unter der Annahme, daß dieser Parameter verfälscht sein könnte (in Richtung eines zu niedrigen Wertes), wenn gerade die Weibchen mit den höchsten DA-Depletionen gestorben wären, wurden so viele der Männchen mit den höchsten Depletionswerten aus den jeweiligen Stichproben ausgeschlossen, wie es der Sterberate in der Weibchen-Stichprobe entspräche. Die DA-Depletionen dieser künstlich selektierten Männchenstichproben im Vergleich zu denjenigen der unselektierten Stichproben sowie der Weibchenstichproben sind in Abb. 44 dargestellt.

[6] Die beiden genannten Vorfälle haben sich ereignet, da beim Injizieren einer Substanz mit einem für die Experimentatoren so hohen Gefährdungspotential wie bei MPTP trotz gut eingeübter Prozeduren vereinzelt kritische Situationen auftreten können (z.B. Beißgefahr), bei denen im Zweifelsfall die Tiere zwecks Fixierung sehr fest gehalten wurden.

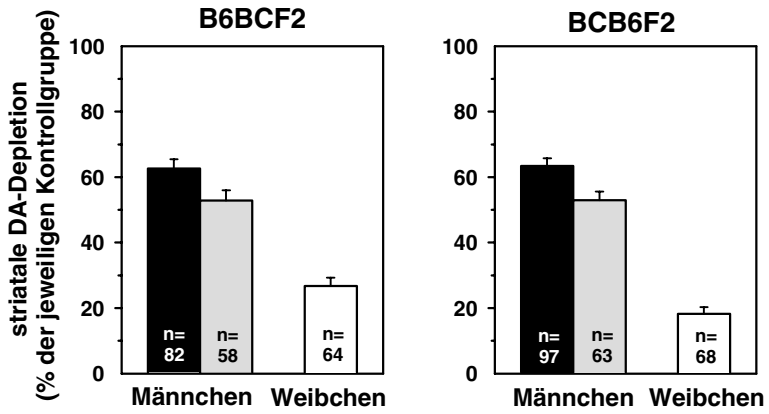

Abb. 44. Neostriatale Dopamin-Depletion (Mittelwerte und Standardfehler) vor (schwarze Balken) und nach (graue Balken) einer Reduktion der Männchenstichprobe um den Prozentsatz, der der Letalitätsrate in der korrespondierenden Weibchen-Stichprobe entspricht. Ausgeschlossen wurden die Tiere mit den höchsten Depletionen. Dargestellt sind die Ergebnisse von MPTP-behandelten Männchen und Weibchen der Stämme B6BCF2 und BCB6F2.

Wie nach einer solchen Manipulation der Stichprobe zu erwarten, lag die mittlere DA-Depletion in den korrigierten Männchen-Stichproben niedriger als in den unkorrigierten; die Differenz betrug allerdings nur etwa 10 Prozentpunkte, so daß auch nach der Simulation von Todesfällen stark lädierter Männchen der massive Unterschied zu den Weibchen erhalten blieb, die eine weitaus geringere DA-Depletion zeigten.

Um potentielle periphere Wirkungen von MPTP exemplarisch zu untersuchen, wurden bei einigen B6BCF2-Tieren die Konzentrationen von Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin im kaudalen Pol des Herzens mittels HPLC bestimmt (Abb. 45). Für alle drei Monoamine war eine numerische Tendenz zu einem Konzentrationsabfall nach MPTP-Gabe erkennbar. Dieser Rückgang war für DA bei den Männchen, für NA und AD bei den Weibchen ausgeprägter, was aber bei den beiden letztgenannten Transmittern aus höheren Mittelwerten der kontrollbehandelten Weibchen im Vergleich zu den Männchen resultierte. Es traten keine Korrelationen mit einem p-Wert unter 0.05 zwischen den Transmitterkonzentrationen im Herz und den DA- sowie NA-Konzentrationen im Neostriatum oder ventralen Striatum auf.

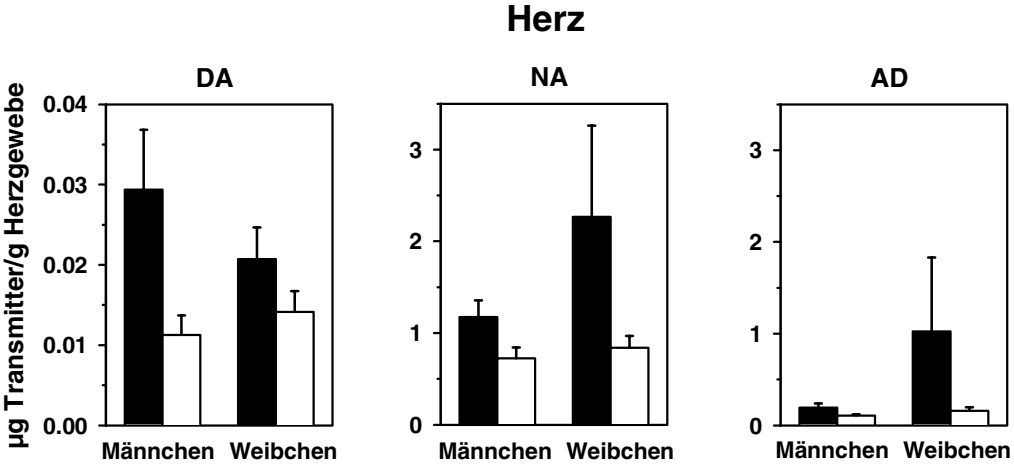

Abb. 45. Konzentration der Transmitter DA, NA und Adrenalin (AD) im kaudalen Pol des Herzens (in µg/g Hirngewebe). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für Männchen und Weibchen des Mausstammes B6BCF2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP4x15 (weiße Balken) erhalten hatten (n=45). Die Skalierung für DA unterscheidet sich von derjenigen für NA und AD.

4.4.3.5 Körpergewicht

Das Körpergewicht änderte sich bei B6BCF1-Kontrolltieren kaum, nahm aber nach MPTP-Behandlung vorübergehend um ca. 1 Gramm ab; bei BCB6F2 kam es in allen Gruppen nach der Injektionsbehandlung zu einer geringfügigen und temporären Gewichtsabnahme. Die Weibchen waren jeweils deutlich leichter als die Männchen (Anhang, Tabelle A-13). Zur Überprüfung der Möglichkeit, daß die gestorbenen Weibchen eventuell aufgrund initial geringeren Körpergewichts stärker ausgekühlt sind, wurden die Gewichte der gestorbenen und der überlebenden Tiere verglichen. Die zahlenmäßigen Unterschiede der Mittelwerte sind jedoch vernachlässigbar: für B6BCF2 20.8±0.3 g (gestorben) vs. 20.8±0.2 g (überlebend) bzw. für BCB6F2 20.7±0.3 g vs. 21.1±0.2 g (Mittelwerte und Standardfehler).

4.4.3.6 Beziehungen der neostriatalen DA-Depletion zu Pigmentierung und Offenfeldverhalten

Um einen Überblick über mögliche Einflüsse der Pigmentierung auf die MPTP-Anfälligkeit zu gewinnen, wurden die neostriatalen DA-Depletionen pigmentierter und unpigmentierter (d.h. Albinos) MPTP-behandelter F2-Tiere verglichen (Abb. 46). Dabei zeigte sich, daß pigmentierte

BCB6F2-Männchen eine mehr als 10 Prozentpunkte höhere Depletion hatten als die entsprechenden Albino-Tiere.

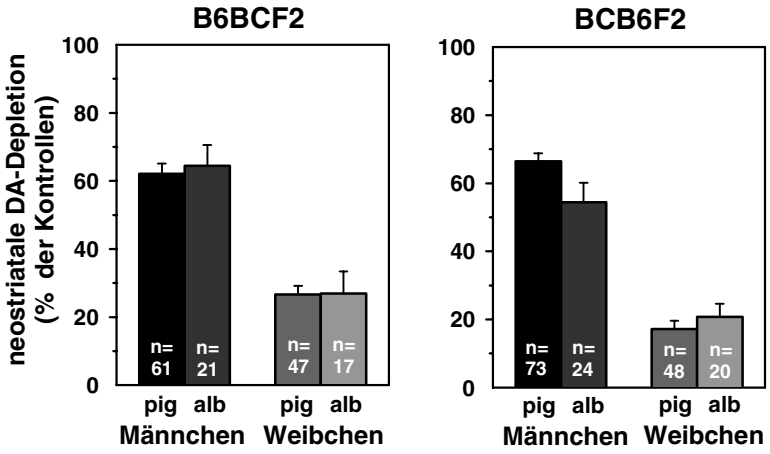

Abb. 46. Neostriatale Dopamin-Depletion (Mittelwerte und Standardfehler) von Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die eine Behandlung mit MPTP4x15 erhalten hatten. Die Werte sind getrennt für pigmentierte (pig) und Albino-(alb) Tiere dargestellt.

Da die Kontrollgruppen nur äußerst wenige Albino-Tiere enthielten, wurden die Depletionen in den MPTP-Gruppen *nicht* auf die DA-Konzentrationen von getrennten pigmentierten vs. Albino-Kontrollen, sondern auf die bezüglich der Pigmentierung gepoolten Kontrollgruppen bezogen. Der Vollständigkeit halber sind die Werte für nach Pigmentierung gruppierte Kontrolltiere jedoch im Anhang wiedergegeben (Tabelle A-14); ein regelhafter Unterschied im neostriatalen DA-Gehalt zwischen pigmentierten und unpigmentierten Kontrollen war daraus nicht erkennbar.

Schließlich wurde eine erneute Auswertung der Lokomotion im Offenfeld durchgeführt, die dazu diente, eine mögliche Beziehung dieses funktionalen Parameters zum neostriatalen DA-Verlust darzustellen. Zu diesem Zweck wurden 2 Extremgruppen gebildet: gering Lädierte, d.h. Tiere mit einer neostriatalen DA-Depletion unter 20%, und stark Lädierte, d.h. Tiere mit einer DA-Depletion über 80% (Abb. 47). Dies war nur bei den Männchen möglich, da bei keinem Weibchen das obere Extrem erreicht wurde.

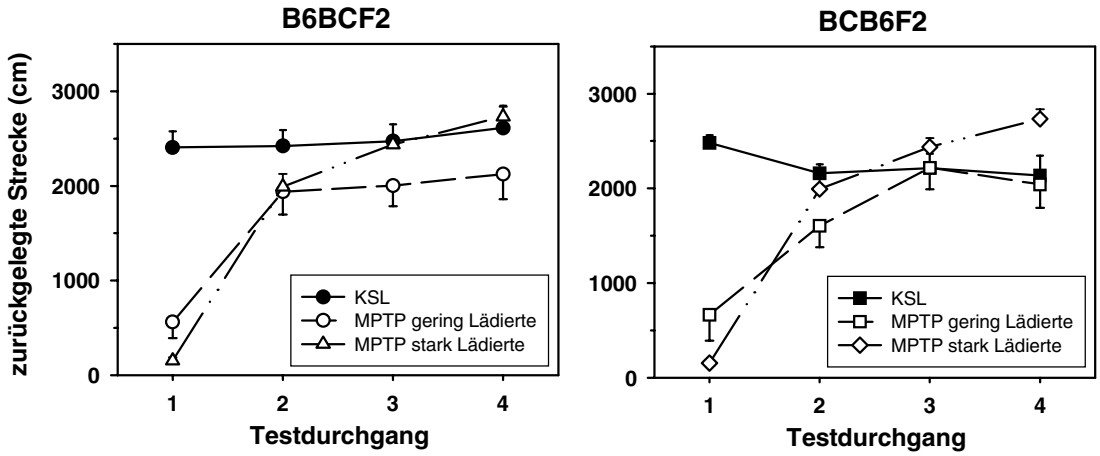

Abb. 47. Zurückgelegte Strecke im Offenfeld (in cm; Mittelwerte und Standardfehler). Dargestellt sind die Daten von Männchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten. Die Werte für die MPTP-Bedingung werden getrennt dargestellt für Tiere, die anhand der neurochemischen Analyse nachträglich als gering lädiert (unter 20% neostriatale DA-Depletion; B6BCF2 n=5, BCB6F2 n=7) oder stark lädiert (über 80% neostriatale DA-Depletion; B6BCF2 n=26, BCB6F2 n=30) eingestuft worden sind. Diese Daten stellen Teilstichproben derjenigen Gruppen dar, die bereits in Abb. 34 gezeigt worden sind.

Am Tag der Behandlung war der Rückgang der Lokomotion bei den stark lädierten Tieren etwas ausgeprägter als bei den schwach lädierten Tieren. Ab Tag 2 zeichnete sich jedoch ein ausgeprägterer Anstieg der Leistungen in der Gruppe der stark Lädierten ab, der teilweise dazu führte, daß diese Tiere sich mehr bewegten als die gering Lädierten und teilweise selbst mehr als die Kontrollen. Zu bestimmten Testzeitpunkten waren demnach stark lädierte Männchen lokomotorisch aktiver als gering lädierte.

Für die Gesamtstichproben von MPTP-behandelten F2-Männchen fand im zeitlichen Verlauf des Experiments eine Umkehr des korrelativen Zusammenhangs von positiven zu negativen Korrelationskoeffizienten zwischen dem neostriatalen DA-Gehalt und der Lokomotion statt (Tabelle 19).

Tabelle 19: Produkt-Moment-Korrelationen zwischen der Lokomotion im Offenfeld und der neostrialen Dopaminkonzentration von Männchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die eine Behandlung mit MPTP4x15 erhalten hatten.

	Lokomotion Tag 1	Lokomotion Tag 2	Lokomotion Tag 3	Lokomotion Tag 4
B6BCF2 (n=81)				
striatales DA	**0.23**	-0.08	-0.17	**-0.24**
BCB6F2 (n=93)				
striatales DA	**0.28**	-0.05	-0.14	**-0.26**

Lokomotion = zurückgelegte Strecke; striatales DA = neostriatale Dopaminkonzentration. Korrelationen mit $p<0.05$ sind fett gedruckt.

4.4.4 Diskussion

Die F2-Generation nahm eine Sonderstellung in der Reihe unserer Experimente ein: Zum einen stellte sie mit über 400 Tieren zahlenmäßig die umfangreichste Stichprobe dar. Zum anderen waren die untersuchten Gruppen der F2-Generation nicht mehr homogen, sondern es bestanden genetische Unterschiede innerhalb der Gruppen; dies hatte zur Folge, daß neben den bisherigen Vergleichen zwischen einzelnen Experimentalgruppen auch die Binnenstruktur der Gruppen stärker ins Blickfeld rückte. Die genannte Zahl untersuchter Tiere war so gewählt worden, daß trotz der beträchtlichen Letalität bei den Weibchen unser gesetztes Ziel von mindestens 300 phänotypisierten und somit für eine spätere QTL-Analyse des Phänotyps "MPTP-Suszeptibilität" verfügbaren Tieren erreicht wurde (siehe Abschnitt 2.2).

Als eines der wichtigen Ergebnisse der aktuellen Untersuchung ist hervorzuheben, daß sich in der F2-Generation - in deutlichem Kontrast zu den vorausgegangenen Generation - ein massiver Einfluß des Geschlechts auf die neurochemisch definierte Anfälligkeit für MPTP zeigte. Der prozentuale neostriatale Dopaminverlust belief sich in beiden Teilkreuzungen bei Weibchen nur auf etwa ein Drittel des Verlustes bei Männchen. Die Depletionen bei den Weibchen waren die geringsten, die in allen drei Generationen gemessen wurden. Parallel dazu fiel die kompensatorische DA-Umsatzsteigerung bei Männchen stärker aus als bei den Weibchen. Eine ähnliche geschlechtsabhängige Konstellation wie im Neostriatum wurde auch im ventralen Striatum gefunden. Die F2-Weibchen können also als sehr MPTP-resistent charakterisiert werden.

Diesen neurochemischen Befunden steht ein anderer frappierender Geschlechtsunterschied gegenüber: In jeder Weibchenstichprobe starb fast ein Drittel der MPTP-behandelten Weibchen an den Folgen der Behandlung, während bei den Männchen praktisch keine Letalität auftrat. Dieses Ergebnis macht die Letalität zu einem wichtigen Phänomen in der F2-Generation. Zwar war bereits in der Parentalgeneration - prozentual gesehen - auch ein nicht unbeträchtlicher Teil von Weibchen an der Behandlung mit der Dosis MPTP4x15 gestorben (und noch gravierender war dies bei der Dosierung MPTP4x20, was jedoch aufgrund der sehr kleinen Stichprobe vorsichtig zu bewerten ist), aber bei den dort wesentlich geringeren Stichprobenzahlen fiel dies in der praktischen Durchführung nicht so sehr ins Gewicht - anders als in der F2-Generation, wo mehr als 60 Tiere gestorben sind. Hier stellte sich die drängende Frage nach der Ursache der Letalität. Einige Studien weisen darauf hin, daß MPTP-Gabe zu einer Abnahme der Körpertemperatur führen kann [147,305,360]. Dieser Effekt ist mutmaßlich auch in unseren Experimenten eingetreten, da uns beim Handhaben der Tiere häufig auffiel, daß diese sich nach MPTP-Gabe sehr kühl anfühlten. Daher liegt es nahe zu spekulieren, ob die Behandlung mit MPTP zu einer letal wirkenden Auskühlung geführt haben könnte. Da ein geringeres Körpergewicht zu einer schnelleren Auskühlung führt, könnte dies bei den Weibchen eine größere Rolle gespielt haben als bei den im Mittel um einige Gramm schwereren Männchen. Die Körpergewichte der gestorbenen und der überlebenden Weibchen unterschieden sich jedoch nicht, was die Körpergewichts-Hypothese zwar nicht direkt widerlegen kann, sie aber nicht stützt. Nach unseren Beobachtungen könnten Krampfanfälle für einige Todesfälle verantwortlich gewesen sein [42,184,263]. Auch Herz-Kreislauf-Stillstand könnte als Todesursache in Frage kommen [184]. Für letzteres sprechen einige unserer Beobachtungen: Erstens konnten wir - wie auch andere [151,292] - im Herzgewebe Tendenzen für einen MPTP-bedingten Konzentrationsrückgang mehrerer Katecholamine feststellen, so daß die Möglichkeit besteht, daß MPTP Herzfunktionen beeinflussen könnte; allerdings waren die Daten nicht eindeutig in dem Sinne interpretierbar, daß dies bei Weibchen in stärkerem Ausmaß geschähe. Zweitens waren wir in der Lage, einige Weibchen unmittelbar vor dem Tod zu beobachten; diese zeigten ein "Schnappen" nach Luft, was starke Atemprobleme vermuten ließ. Damit in Übereinstimmung steht der pathologische Befund an vier Weibchen, die wahrscheinlich an den Folgen eines perivaskulären Ödems gestorben sind - eine Symptomatik, die den Gasaustausch in der Lunge beeinträchtigt. Dies wird ferner gestützt durch eine Arbeit, in der sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen ein Lungenödem nach systemischer Injektion von MPP^+ nachgewiesen wurde [215]. Letzteres läßt zudem die Vermutung zu, daß die letale Wirkung - ebenso wie die neurotoxische - auf MPP^+, nicht auf MPTP zurückzuführen ist, ob-

wohl allerdings auch zentrale Mechanismen in Betracht gezogen worden sind [152]. In der zuvor genannten Studie trat ebenfalls bei Weibchen eine höhere Letalität als bei Männchen auf [215], und interessanterweise bewirken MAO-B-Hemmer eine Letalitätsminderung [341]. Die Tatsache, daß drei der vier untersuchten Weibchen im Östrus gestorben sind, wirft die Frage auf, ob hormonelle Einflüsse für den Geschlechtsunterschied verantwortlich sein könnten.

Aufgrund der Letalität kam es in den beiden Weibchenstichproben zu einer drastischen Reduzierung der Zahl von Tieren, in denen *post mortem* neurochemische Veränderungen bestimmt werden konnten. Es bestünde deshalb die Möglichkeit, daß die gefundenen niedrigen Mittelwerte für die neostriatalen DA-Depletionen der F2-Weibchen ein methodisches Artefakt sein könnten und daraus resultierten, daß vornehmlich Weibchen mit einer starken DA-Depletion gestorben sind. Dies würde eine positive Beziehung zwischen der Empfindlichkeit für die toxischen und die neurotoxischen Wirkungen von MPTP voraussetzen. Eine *post mortem* neurochemische Analyse gestorbener Tiere ist allerdings nicht praktikabel, um diese Frage zu klären. Dazu müßten nämlich die Tiere rund um die Uhr überwacht werden, um den Todeszeitpunkt festzustellen; dann hätte sofort eine Hirnentnahme und Entnahme der Gewebeproben zu erfolgen, um einen unkontrollierten Abbau von Neurotransmittern durch residuale Enzymaktivität zu verhindern. Dies hätte aber den Nachteil, daß die Konzentrationsbestimmung der Monoamine nicht sieben Tage nach MPTP-Gabe erfolgen würde und somit mit den Werten überlebender Tiere nicht vergleichbar wären. Als Alternative wurde deshalb eine Simulation vorgenommen, bei der die am stärksten betroffenen Männchen aus der Stichprobe ausgeschlossen wurden, und zwar prozentual so viele, wie es der Letalitätsrate der Weibchen entsprach. Vorausgesetzt wurde dabei das Szenario, daß gerade alle neurochemisch am stärksten geschädigten Weibchen gestorben sind. Das Ergebnis der Simulation fiel recht eindeutig aus: Obwohl der Depletions-Mittelwert der Männchenstichprobe sich durch die Simulation um etwa 10 Prozentpunkte verringerte und sich damit dem niedrigen Niveau der Weibchen annäherte, blieb dennoch ein massiver Abstand bestehen. Dies berechtigt zu der Annahme, daß die beobachtete Dissoziation zwischen toxischen und neurotoxischen MPTP-Effekten kein methodisches Artefakt darstellt, sondern in der F2-Generation tatsächlich vorhanden ist. Einschränkend ist jedoch anzumerken, daß noch die Möglichkeit bestünde, daß die Depletionen der gestorbenen Weibchen höher als die der höchsten Depletionen bei den Männchen gewesen sein könnten.

Der Befund, daß Weibchen weniger anfällig für die Neurotoxizität von MPTP sind, ist grundsätzlich nicht unbekannt [104,148]. Dluzen et al. vermuten, daß das Sexualhormon Östrogen dabei eine wichtige Rolle spielt, welches den DAT hemmen und so den Eintritt von MPP^+ in die dopaminergen Neuronen reduzieren könnte [19]. Die F2-Befundlage kontrastiert allerdings deutlich mit den Ergebnissen in der Parentalgeneration, wo der striatale Dopaminverlust bei den Weibchen ebenso hoch ausfiel wie bei den Männchen. Diejenigen Arbeiten, die eine neuroprotektive Rolle von Östrogen fanden, wurden meist *in vitro* in gonadektomisierten und hormon-substituierten Tieren [98,103,104] bzw. in anderen Mausstämmen [148] durchgeführt. Dagegen beobachteten Unzeta et al. [434] 10 Tage nach Behandlung sogar stärkere neurotoxische Effekte bei C57BL-Weibchen und führten dies auf geschlechts- und zyklusabhängige Unterschiede in der MAO-B Aktivität zurück. Zwar ist nicht auszuschließen, daß sich solche gegensätzlichen Effekte in den Parentaltieren zufällig herausgemittelt haben, weil Tiere in entsprechend unterschiedlichen Zyklusphasen getestet wurden; allerdings wären dann bei den Weibchen höhere Streuungswerte in der DA-Depletion zu erwarten, die jedoch tatsächlich nicht vorlagen. Daher bleibt offen, warum Geschlechtsunterschiede in der MPTP-Anfälligkeit im Verlaufe unser Experimentreihe erst in der F2-Generation auftraten. Eine Interaktion mit genetischen Faktoren ist dabei nicht ausgeschlossen: Beispielsweise könnte bei F2-Weibchen der Östrogenspiegel höher liegen als in der Parentalgeneration, oder das Verhältnis von zentraler zu peripherer Metabolisierung von MPTP (siehe dazu z.B. [434,468]) könnte sich so verändert haben, daß mehr MPP^+ peripher letal wirkt, jedoch weniger zentral neurotoxisch. An einem solchen komplexen, geschlechtsabhängigen Phänomen könnte ein Locus beteiligt sein, der auf den Geschlechtschromosomen liegt.

Über den potentiellen Einfluß der Pigmentierung auf die MPTP-Anfälligkeit ist mehrfach spekuliert worden (siehe Review [124]), da pigmentierte Mäuse in Stammvergleichen meist stärkere Läsionen aufwiesen als unpigmentierte (siehe Tabelle 2). Nicht auszuschließen ist, daß dieser Zusammenhang angesichts der überschaubaren Zahl der in diesen Studien verwendeten Inzuchtstämme ein rein zufälliges Zusammentreffen des Albino-Allels und eines oder mehrerer unbekannter Suszeptibilitätsgene darstellt. Unter der Annahme, daß diese Gene auf verschiedenen Chromosomen liegen (d.h. unabhängig vererbt werden), müßte dieser Zusammenhang in der F2-Generation verlorengehen. Geschieht dies nicht, wäre dies ein Hinweis, daß das Albino-Gen tatsächlich MPTP-relevant ist oder ein solches relevantes Gen mit dem Albino-Gen gekoppelt vererbt wird. Unser Ergebnis ist diesbezüglich allerdings nicht eindeutig: Albino-Weibchen waren (neurochemisch) so anfällig wie pigmentierte Weibchen. Da bei

den in Tabelle 2 aufgeführten Studien nahezu ausschließlich Männchen untersucht worden sind, ist jedoch ohnehin offen, ob der postulierte Zusammenhang für Weibchen Geltung besitzt. Während allerdings bei B6BCF2-Männchen ebenfalls kein Pigmentierungseffekt zu erkennen war, zeigte sich bei den BCB6F2-Männchen in den Albinos eine um gut 10 Prozentpunkte niedrigere Depletion. Die Ergebnisse sind also nicht eindeutig, und die postulierte Beziehung bedarf demnach weiterer Prüfung mit anderen Methoden.

Nicht unerwähnt bleiben soll die Tatsache, daß die Berechnung von DA-Depletionen in der F2-Generation potentiell ein methodisches Problem birgt: Da sich bereits die Kontrollgruppen unserer Parentalstämme hinsichtlich ihres DA-Gehalts unterschieden und auch bekannt ist, daß die Funktion von DA-Systemen einer genetischen Steuerung unterliegt [338,356,411], wäre für Individuen der F2-Generation zu erwarten, daß sich ihre DA-Spiegel bereits ohne MPTP-Behandlung aufgrund ihrer unterschiedlichen genetischen Ausstattung voneinander unterscheiden. Für die MPTP-Tiere ist der individuelle, tatsächliche Ausgangswert jedoch nicht bekannt, und die Berechnung der Depletion anhand der (ebenfalls intern variierenden) Kontrollgruppe wäre daher mit einem größerem Fehler behaftet als in der genetisch homogenen Parentalgeneration. Für dieses Problem gibt es keine befriedigende Lösung; allerdings waren die Variationskoeffizienten für den DA-Gehalt in den Striata der F2-Kontrollen nicht höher als in der Parentalgeneration, so daß in der Praxis das Problem offenbar keine große Relevanz besitzt.

Hinsichtlich der in der F2-Generation erhobenen Parameter sind, wie eingangs erwähnt, nicht nur die Mittelwerte, sondern auch die Verteilungen interessant. Diese wurden exemplarisch für den sehr wichtigen neurochemischen Läsionsparameter der neostriatalen DA-Depletion dargestellt. Dabei zeichnete sich bei den Männchen und hier stärker bei B6BCF2 eine zweigipflige Verteilung ab. Der kleinere der beiden Gipfel fällt auch in die Nähe des Gipfels der eingipfligen Verteilung der Weibchen-Gruppen. Zum jetzigen Zeitpunkt spekulativ, aber natürlich hochinteressant ist die Frage, ob diese Gipfel mit Suszeptibilitätsallelen assoziiert sind, die sich QTL-analytisch identifizieren lassen werden.

Die Untersuchung der Gruppen-Binnenstruktur hat ferner zu einem unerwarteten Ergebnis hinsichtlich der Beziehung zwischen Verhaltens- und neuralen Parametern geführt: Im Offenfeld hat MPTP, wie in den beiden vorhergehenden Generationen auch, am Tag der Behandlung eine massive Reduktion der Lokomotion bewirkt; an Tag 2 war die Bewegungsaktivität

der Tiere im Mittel wieder auf Kontrollniveau - ähnlich wie im resistenten Parentalstamm BALB/c. An den Tagen 3 und 4 lag das Niveau zahlenmäßig in drei der vier MPTP-behandelten Gruppen sogar etwas höher als bei deren Kontrollen. In einer gesonderten Analyse bildeten wir bei den männlichen F2-Gruppen, die mit MPTP behandelt worden waren, im Nachhinein anhand der Ergebnisse der neurochemischen Analyse Extremgruppen - mit striatalen DA-Depletionen unter 20% bzw. über 80%; die Beschränkung auf Männchen war darin begründet, daß keine Weibchen derart hohe Depletionen hatten. Am ersten Tag lag das Lokomotionsniveau der stark lädierten Tiere (Mittelwert der DA-Depletion in beiden F2-Gruppen: 85%) erwartungsgemäß noch etwas unter dem Niveau der gering lädierten Tiere. An den weiteren drei Tagen zeigten die stark Lädierten jedoch stets ein *höheres* Aktivitätsniveau als die gering Lädierten, und dieses lag teilweise sogar über dem Kontrollniveau. Es lag in der F2-Generation also eine andere Situation vor als in der Parentalgeneration, wo die stark lädierte Gruppe (C57BL/6; Mittelwert der DA-Depletion: 83%) auch durchgängig die stärkeren Defizite hatte als die gering lädierte Gruppe (BALB/c). In den F2-Männchen bestehen scheinbar noch komplexere differentielle Erholungsverläufe als in der Parentalgeneration, denn auch für die Gesamtheit der männlichen F2-Tiere (nicht nur für deren Extrema) zeigte sich vom ersten zum vierten Testtag eine Richtungsumkehr der Korrelationen zwischen DA-Konzentration und Lokomotion: War anfangs noch eine niedrige DA-Konzentration mit *geringer* Lokomotion korreliert, ist drei Tage später eine niedrige DA-Konzentration eher mit *hoher* Lokomotion verknüpft (dabei ist anzumerken, daß die Korrelationskoeffizienten wesentlich niedriger ausfallen als im Stamm C57BL/6). Daraus läßt sich ableiten, daß lokomotorische Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten inhaltlich verschieden gedeutet werden muß. Da der Zeitpunkt der Umkehr für jedes einzelne Tier individuell verschieden sein könnte und wir diesen im Einzelfall nicht kennen, ist fraglich, ob dieses Verhalten in der MPTP-behandelten F2-Generation einen geeigneten phänotypischen Indikator für ein funktionales Defizit darstellt. Insgesamt scheint ein ähnliches zeitliches Muster vorzuliegen wie in einigen Studien, deren Ergebnisse in Tabelle 1 als "überschießende Erholung" charakterisiert wurde. Eine einfache Erklärung läßt sich hierfür nicht liefern, da uns nur ein Typ von neurochemischen Daten vorliegt (*post mortem*-Messung von Transmittergehalten nach 7 Tagen). Stellt man sich funktionale Erholung auf neuraler Ebene allerdings als mehrdimensionalen Prozeß vor, könnte man weiter annehmen, daß die Einzelprozesse unterschiedliche zeitliche Verläufe nehmen könnten, die zu den beobachteten Fluktuationen auf funktioneller Ebene führen. Die potentielle Natur der funktionellen Erholung im MPTP-Mausmodell wird in der Abschlußdiskussion erörtert. Auch die Daten zum Nestbau deuteten in gewisser Weise auf einen nicht

monotonen Zusammenhang zwischen funktionaler und neuraler Betrachtungsebene: Obwohl ein MPTP-bedingter Anstieg der Nestbaulatenz ohnehin in nur sehr geringem Maße zu verzeichnen war, bauten nicht nur Männchen, sondern auch einige Tiere aus der Gruppe der (wesentlich geringer lädierten) Weibchen mit Verzögerung ein Nest.

In anderen Verhaltenstests zeigten sich erneut MPTP-bedingte Veränderungen. Im Greif-Test und im Rotarod erscheinen die gemessenen Defizite jedoch wenig trennscharf bzw. sehr gering, so daß deren Daten für eine QTL-Analyse MPTP-bedingter Verhaltensdefizite vermutlich nicht geeignet sein werden. Beim Rotarod käme zusätzlich das Problem ins Spiel, daß bereits die Basalleistung durch die jeweilige genetische Ausstattung bedingt zu sein scheint, da sich die Kontrollen der Parentalstämme stark unterschieden. Im Einzelfall sind die Leistungen nicht eindeutig interpretierbar, da eine niedrige Leistung in einem F2-Tier auf eine starke Läsion oder auf dessen Ausstattung mit den "Rotarod-BALB/c-Allelen" zurückgehen könnte. Im Pole-Test waren die Gruppen-Mittelwerte nicht aussagekräftig im Sinne MPTP-bedingter Defizite. Wieder wurde eine ausgeprägte Tendenz festgestellt, daß eine Reihe unlädierter Tiere die Stange nicht verließ. Wurden diejenigen Tiere, die dies Verhalten am vierten Tag zeigten, aus der Stichprobe entfernt, zeigte sich ein Ergebnismuster, das dem Muster bei C57BL/6-Tieren ähnelte. Das Verhalten an Tag 4 scheint deshalb gut geeignet zu sein, um Tiere als Stangen-Verlasser bzw. Nicht-Verlasser zu kategorisieren. Eine Erklärung für diese qualitativ unterschiedliche Tendenz steht jedoch weiterhin aus. Beim Plus-Maze ist schließlich interessant, daß - wie zuvor bei den F1-Tieren - eine leichte Tendenz zu höheren Offenarmzeiten bei MPTP-behandelten Tieren bestand; dies müßte im Rahmen des Tests in Sinne verringerter Ängstlichkeit gedeutet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Untersuchung einer F2-Generation hinsichtlich ihrer MPTP-Anfälligkeit zu teilweise überraschenden Befunden geführt hat, z.B. dem Auftreten einer geschlechtsabhängigen Dissoziation zwischen Letalität und Neurotoxizität oder der nicht-monotonen Beziehung zwischen Verhaltensmaßen und neurochemischen Läsionskennwerten bis hin zur Frage der Verteilung dieser Kennwerte. Bei der Klärung einiger dieser Fragen wird eventuell die QTL-Analyse ihren Beitrag leisten können, für andere sind wahrscheinlich weitere aufwendige Untersuchungen nötig. Zwei Fragestellungen sollen jedoch im Rahmen dieser Arbeit noch in gesonderten, überschaubaren Experimenten angegangen werden: Zum einen soll der Einfluß der Pigmentierung auf die Neurotoxizität mittels eines Vergleichs zweier Stämme, die sich nur im Albino-Gen unterscheiden, vorgenommen

werden (Folgeuntersuchung 1). Zum anderen soll der Frage nachgegangen werden, ob die Letalität der Weibchen an ihren Zyklus (bzw. die dahinter liegenden Hormonschwankungen) gekoppelt ist (Folgeuntersuchung 2).

4.5 Folgeuntersuchung 1: Tyrosinase

4.5.1 Einleitung

In diesem Experiment wollten wir die Möglichkeit untersuchen, ob das Vorhandensein von Pigmentierung die Anfälligkeit für MPTP erhöhen könnte. Ein solcher Zusammenhang hatte sich beim Vergleich pigmentierter gegenüber unpigmentierten Männchen in der BCB6F2-Kreuzung der F2-Generation angedeutet und ist auch in der Vergangenheit bereits von anderen Autoren diskutiert worden [124,200].

Die Synthese des Pigmentfarbstoff Melanin wird durch das Enzym Tyrosinase katalysiert. Letzteres stellt daher ein Kandidatengen für MPTP-Suszeptibilität dar. Um dies zu prüfen, wählten wir den Ansatz eines Vergleichs koisogener Stämme: Entsteht in einem Inzuchtstamm spontan eine Mutation und werden die Träger einen solchen Mutation gezielt selektiert und zu einer eigenständigen Linie weitergezüchtet, so unterscheidet sich die neue Linie vom Ausgangsstamm allein in dem mutierten Gen; phänotypische Unterschiede zwischen koisogenen Stämmen können bei gleichen Umweltbedingungen auf den Einfluß der Mutation zurückgeführt werden [264]. Im Jahre 1970 ist beim Mausstamm C57BL/6 im Tyrosinase-Gen eine c^{2j} genannte Punktmutation aufgetreten, die dazu führt, daß keine Tyrosinase gebildet wird, das Enzym, welches die Produktion von Melanin katalysiert [253]. Da keine Melaninproduktion erfolgen kann, sind Träger dieser Mutation Albinos. Die Mutation wurde in einer Linie namens C57BL/6J-*Tyr*$^{c\text{-}2J}$ fortgeführt. Wir verglichen diese Albino-Linie mit dem koisogenen pigmentierten Wildtyp C57BL/6. Ein Unterschied in der MPTP-Wirkung zwischen diesen beiden Stämmen würde einen starken Beleg für einen Einfluß der Pigmentierung auf MPTP-Anfälligkeit darstellen. Der Versuch wurde nur mit Männchen durchgeführt, da in der F2-Generation nur für dieses Geschlecht eine entsprechende Beziehung gefunden worden ist.

4.5.2 Durchführung

Versuchstiere waren 24 männliche Mäuse des Stammes C57BL/6J (Tyr+)[7] und 23 männliche Mäuse des Stammes C57BL/6J-*Tyr*$^{c\text{-}2J}$ (Tyr-) mit einem Alter von 8 bis 10 Wochen. Da die Mutanten nicht von der TVA geliefert werden konnten, wurden alle Tiere - der Wildtyp ein-

[7] Der Stamm C57BL/6J aus der Jackson-Lieferung entspricht genetisch demjenigen Stamm C57BL/6J, der für die Parentaluntersuchung von der TVA bezogen worden war. Die hier gewählte Abkürzung Tyr+ dient dazu, den anderen Geburtsort und die Vorerfahrung des Luftfrachttransportes, welche Tyr+ und Tyr- gegenüber der von uns als C57BL/6 bezeichneten Gruppe von Tieren gemeinsam haben, hervorzuheben.

geschlossen - im Alter von ca. 4 Wochen vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen und per Luftfracht nach Düsseldorf transportiert. Obwohl eine relativ neue laborübergreifende Studie erstaunlicherweise nahezu keinen Einfluß eines solchen Transports auf mehrere Verhaltensvariablen nachweisen konnte [84], wurden die Tiere vor Beginn der Experimente mindestens 4 Wochen in der TVA gehalten, um eine ausreichende Akklimatisierung zu gewährleisten.

Je die Hälfte der Tiere jedes Stammes wurde mit dem Schema MPTP4x15 behandelt. Den übrigen Tieren, die als Kontrolle dienten, wurde Kochsalzlösung (KSL) injiziert. Der Versuchsablauf entsprach in sämtlichen Prozeduren der Untersuchung der F1-Generation.

4.5.3 Ergebnisse

4.5.3.1 Verhalten

Offenfeld

Die im Offenfeld zurückgelegte Strecke war bei den Kontrollgruppen nahezu identisch (Abb. 48); es war hier ein Trend zu abnehmender Lokomotion im Verlauf der vier Testdurchgänge erkennbar.

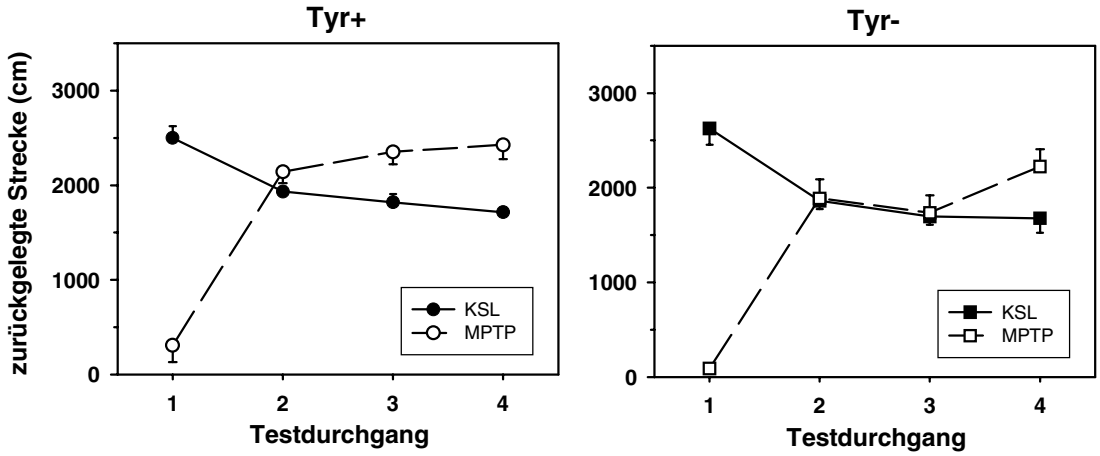

Abb. 48. Zurückgelegte Strecke im Offenfeld (in cm; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen der Maustämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=47). Die Testdauer betrug 10 Minuten; die erste Messung erfolgte 1 Stunde nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

MPTP reduzierte die Lokomotion an Tag 1 drastisch; ab Tag 2 war allerdings in beiden MPTP-Gruppen bereits wieder das Niveau der Kontrollen erreicht, bei Tyr+ lag es an den Tagen 3 und 4, bei Tyr- an Tag 4 sogar etwas höher. Die ANOVA für den Parameter $a_{1(\text{zurückgelegte Strecke})}$ (Tabelle 20) ergab dementsprechend einen signifikanten Effekt für den Faktor Behandlung ($F_{1,43}$=51.77, p<0.0001) mit höheren Steigungen für die MPTP-Bedingung, nicht jedoch für den Faktor Stamm ($F_{1,43}$=0.12, p=0.7360) oder die Interaktion Stamm x Behandlung ($F_{1,43}$=0.01, p=0.9332).

Tabelle 20. Linearer Trend (Mittelwerte und Standardfehler) der zurückgelegten Strecke im Offenfeld von Männchen der Mausstämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	Tyr+		**Tyr-**	
	KSL (n=12)	**MPTP (n=12)**	**KSL (n=11)**	**MPTP (n=12)**
$\mathbf{a_{1(zurückgelegte\ Strecke)}}$	-133.4±29.2	290.3±44.6	-148.2±50.7	265.7±89.3

Der Blick auf die Mittelwerte der Gesamtdauer der Aufrichtaktivität (Abb. 49) zeigt, daß diese an Tag 1 fast vollständig unterdrückt war.

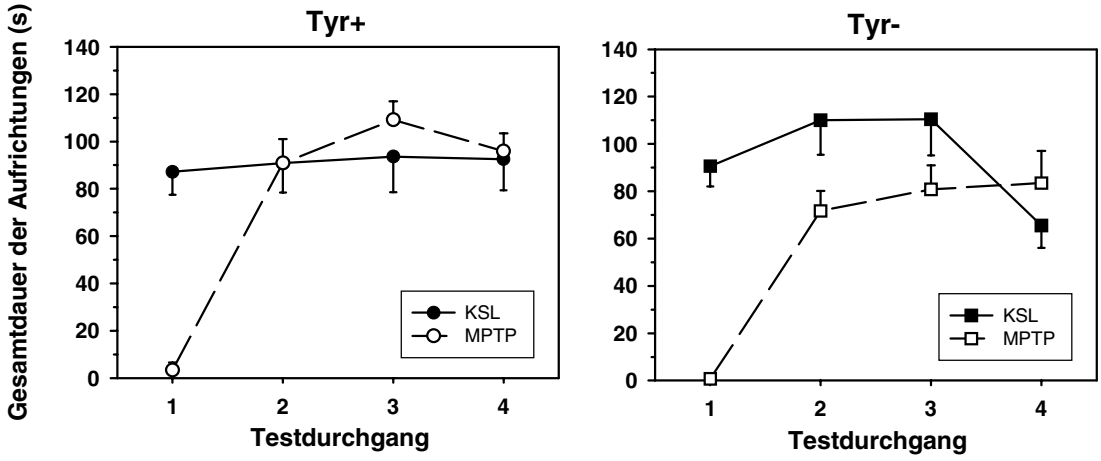

Abb. 49. Gesamtdauer der Aufrichtungen im Offenfeld (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen der Maustämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=47). Die Testdauer betrug 10 Minuten; die erste Messung erfolgte 1 Stunde nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Der Wildtyp erreichte augenscheinlich bereits ab Tag 2 Kontrollniveau, während dies bei den Mutanten vollständig erst an Tag 4 geschah; einschränkend muß jedoch gesagt werden, daß bei deren Kontrollen parallel ebenfalls ein Niveauanstieg erfolgte.

Die Defäkation nahm in allen Gruppen über den Testzeitraum von 4 Tagen zu. In den MPTP-Gruppen beider Stämme war am Tag der Behandlung praktisch keine Defäkation festzustellen; allerdings lag das Niveau an diesem Tag auch in der Kontrollgruppe (KSL) des Stamms Tyr- sehr niedrig. Bereits an Tag 2 hatte die Defäkation in den MPTP-Gruppen wieder Kontrollniveau erreicht und lag bei Tyr- sogar etwas darüber (Anhang, Tabelle A-15).

Nestbau

In den Kontrollgruppen beider Stämme haben alle Tiere einen Tag nach der Behandlung mit dem Nestbau begonnen (Tabelle 21). Beim Vergleich von Kontroll- und Experimentalgruppen mittels Kontingenztafeltest liegen die p-Werte für den Stamm Tyr+ bei 1.0000, für den Stamm Tyr- bei 0.0183. Dies weist auf einen Anstieg der Nestbaulatenz bei Tyr-, nicht aber bei Tyr+ hin.

Tabelle 21. Nestbauverhalten von Männchen der Mausstämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

Nestbaubeginn	Tyr+		Tyr-	
	KSL (n=12)	MPTP (n=12)	KSL (n=11)	MPTP (n=12)
nach 1 Tag	100%	92%	100%	50%
nach 2 Tagen	0%	8%	0%	8%
nach 3 Tagen	0%	0%	0%	33%
nach 4 Tagen	0%	0%	0%	8%

Angegeben sind relative Häufigkeiten des Nestbaubeginns in Prozent der jeweiligen Gruppengröße. Die Zeitangaben sind bezogen auf den Tag der Behandlung.

Greif-Test

Zwischen den beiden untersuchten Stämmen lag ein allgemeiner Niveauunterschied vor in dem Sinne, daß deutlich mehr Tiere des Stammes Tyr+ als Tyr- das Kriterium erfüllten. Der Prozentsatz der Tiere, die die Plattform erreicht hatten, lag in den Kontrollgruppen (KSL) an

beiden Tagen höher als in den MPTP-Gruppen und lag in sämtlichen Gruppen an Tag 2 höher als an Tag 1 (Abb. 50).

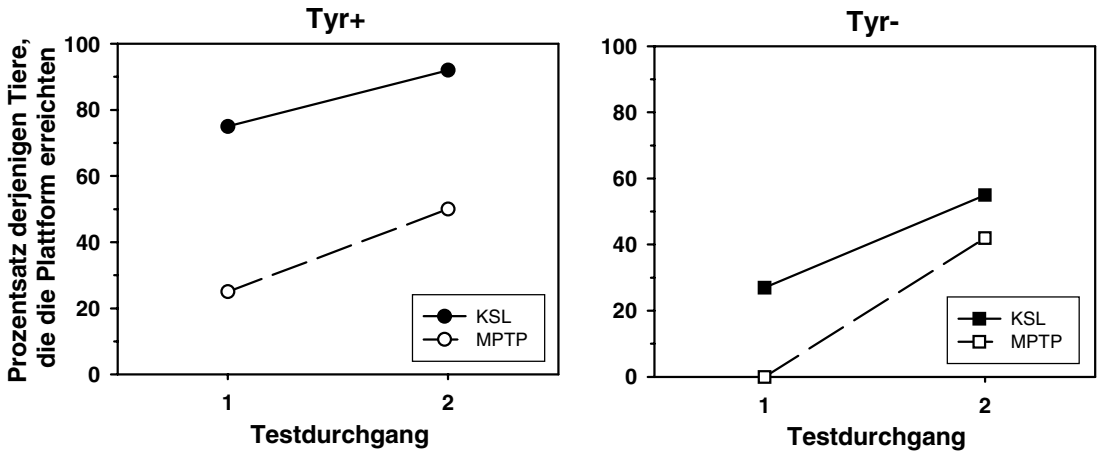

Abb. 50. Greif-Test: relative Häufigkeiten des Kriterium "Plattform vollständig betreten". Getestet wurden Männchen der Mausstämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=47). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 2 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Rotarod

Alle Versuchsgruppen wiesen bei Testwiederholung einen deutlichen Anstieg der Aufenthaltsdauer auf der rotierenden Walze auf, wobei das Niveau der MPTP-Gruppen jeweils nur geringfügig unter dem der Kontrolltiere lag. Das Leistungsprofil der beiden Stämme unterschied sich darin, daß die Mutanten insgesamt, hauptsächlich jedoch am ersten Tag, etwas längere Aufenthaltszeiten erzielten als der Wildtyp (Abb. 51).

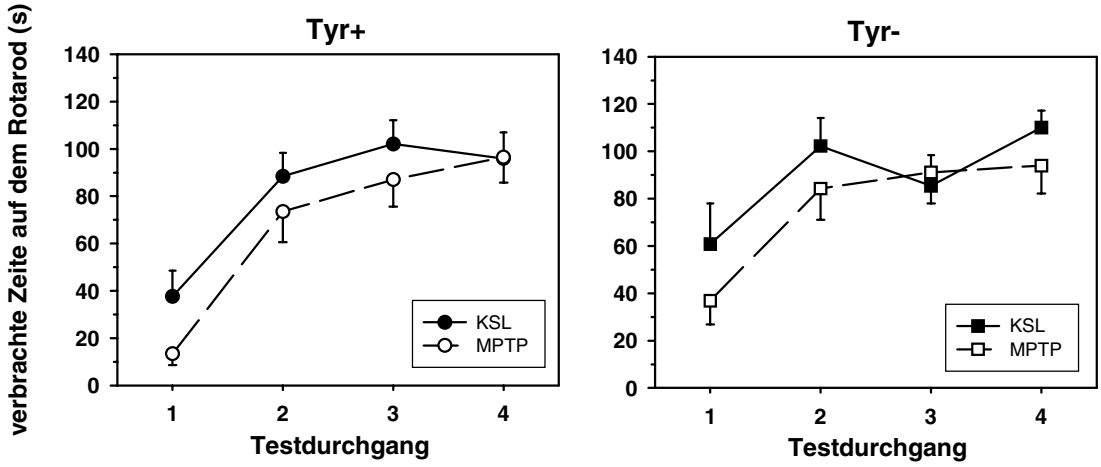

Abb. 51. Rotarod: Verbrachte Zeit auf der rotierenden Walze (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen der Mausstämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=47). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 2.5 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Pole-Test

Für die Aufenthaltszeit auf der Stange ergab sich für den Stamm Tyr+ ein sehr ähnliches Profil wie für die C57BL/6-Männchen, die in der Parentalgeneration untersucht worden waren: Die Kontrollgruppe (KSL) erreichte an Tag 1 im Mittel nach knapp 40 Sekunden den Boden und steigerte diese Leistung auf weniger als 20 Sekunden an Tag 4. Die Tyr+-MPTP-Tiere benötigten für diese Verhaltensweise an den ersten beiden Tagen wesentlich länger und näherten sich im Mittel erst ab Tag 3 dem Niveau ihrer Kontrollen. Die Mutanten (Tyr-) wiesen prinzipiell ein vergleichbares Ergebnismuster auf; allerdings verweilten deren Kontrolltiere an den ersten beiden Tagen im Mittel deutlich länger auf der Stange als die Tyr+-Kontrollen, so daß der Leistungsunterschied zu den MPTP-behandelten Tieren an diesen Tagen deutlich geringer ausfiel als im Wildtyp (Abb. 52). Die höheren Mittelwerte lassen sich teilweise darauf zurückführen, daß an diesen beiden Tagen bei den Mutanten - anders als beim Wildtyp - nicht alle Kontrolltiere die Stange während des Beobachtungszeitraums von 120 s verlassen haben (Anhang, Tabelle A-16).

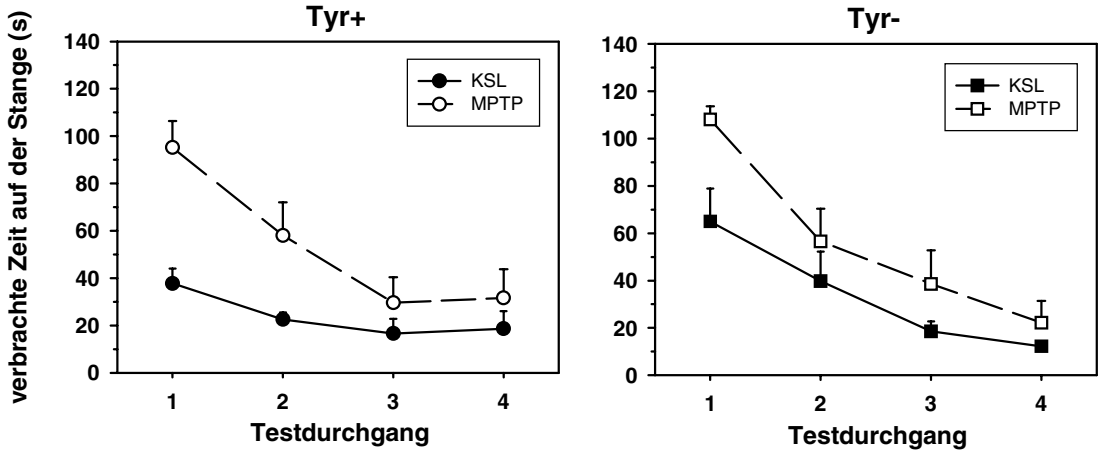

Abb. 52. Pole-Test: Auf der Stange verbrachte Zeit bis zum vollständigen Betreten des Bodens (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen der Mausstämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=47). Die Testdauer betrug maximal 120 s. Die erste Messung erfolgte 3 Stunden nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Elevated Plus-Maze

Die auf den Offenarmen des Plus-Maze verbrachte Zeit nahm in allen Gruppen von der ersten zur zweiten Testung ab (Abb. 53).

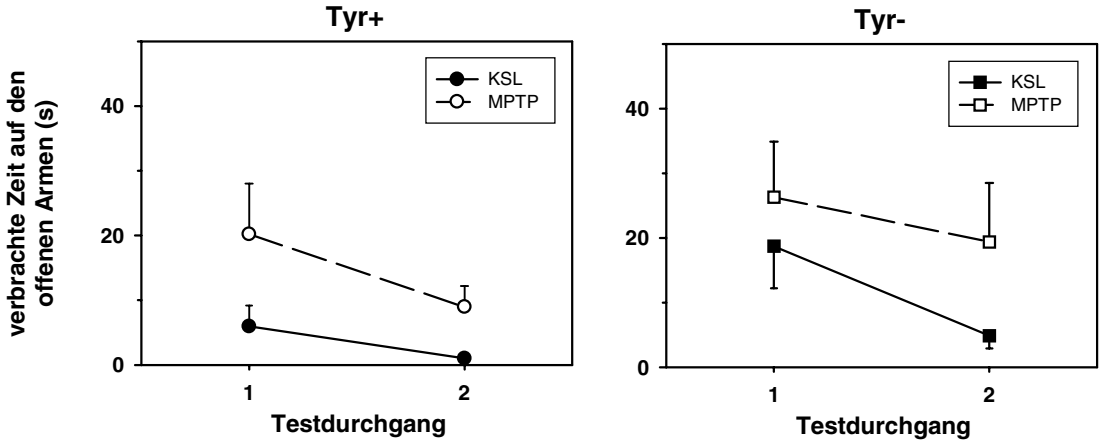

Abb. 53. Aufenthaltszeiten auf den offenen Armen des Elevated Plus-Maze (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen der Mausstämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Symbole) oder MPTP4x15 (weiße Symbole) erhalten hatten (n=47). Die Testdauer betrug 5 Minuten. Die erste Testung erfolgte 2 Tage nach der letzten Injektion. Die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen betrug einen Tag.

Die MPTP-behandelten Gruppen hatten höhere Mittelwerte für die Offenarmzeiten als die Kontrollgruppen (KSL); die Mutanten schienen generell die offenen Arme etwas länger zu betreten als der Wildtyp.

4.5.3.2 Neurochemie

Neostriatum (Abb. 54)

Eine ANOVA für den Dopamingehalt im Neostriatum ergab einen signifikanten Behandlungseffekt ($F_{1,43}$=791.1, p<0.0001); der Faktor "Stamm" erwies sich nicht als signifikant ($F_{1,43}$=0.62, p=0.4351), wohl aber die Interaktion "Stamm" x "Behandlung" ($F_{1,43}$=4.99, p=0.0308). Eine *post hoc*-Testung (Tukey's HSD) ergab jedoch weder einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollgruppen (p=0.7442) noch zwischen den MPTP-Gruppen der Stämme (p=0.1510). Die DA-Depletion betrug bei den MPTP-behandelten Tieren des Stammes Tyr+ 73%, bei Tyr- 82%.

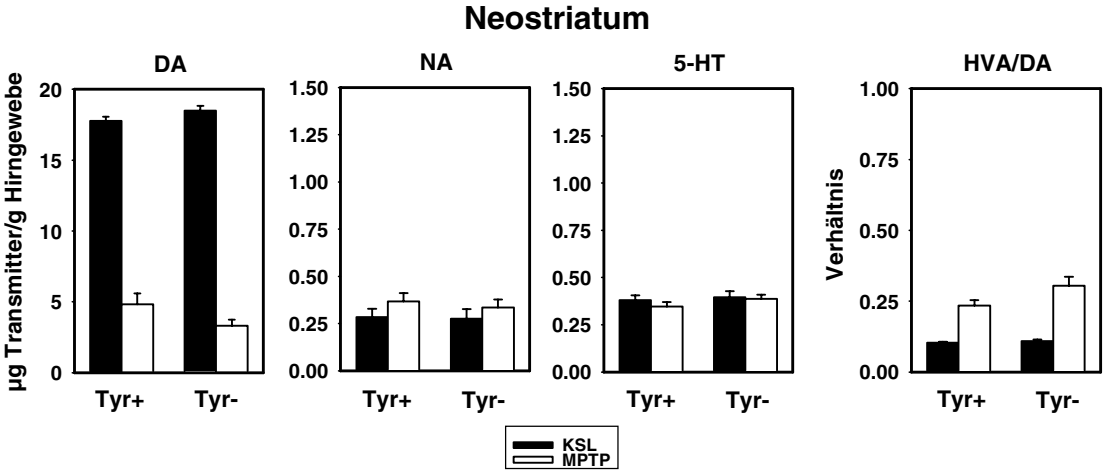

Abb. 54. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im Neostriatum. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für Männchen der Mausstämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP4x15 (weiße Balken) erhalten hatten (n=47).

Eine ANOVA für das Verhältnis HVA/DA erbrachte folgende Resultate: Faktor "Behandlung" $F_{1,43}$=74.64, p<0.0001 im Sinne eines Anstiegs bei MPTP-Behandlung; Faktor "Stamm" $F_{1,43}$=4.08, p=0.0497 im Sinne höherer Werte für Tyr-; Interaktion "Stamm" x "Behandlung" $F_{1,43}$=2.83, p=0.0997. ANOVAs für die Transmitter NE und 5-HT ergaben für keinen Faktor p-Werte unter 0.10.

ventrales Striatum (Abb. 55)

Für die DA-Konzentrationen im ventralen Striatum deutete die entsprechende ANOVA in Richtung niedrigerer Werte nach MPTP (Faktor "Behandlung" $F_{1,43}$=57.45, p<0.0001) und generell niedrigerer Werte bei den Mutanten (Faktor "Stamm" $F_{1,43}$=5.22, p=0.0274). Die DA-Depletionen nach MPTP betrugen 35% (Tyr+) bzw. 39% (Tyr-). ANOVAs für die Transmitter NA und 5-HT sowie für das Verhältnis HVA/DA ergaben für keinen Faktor p-Werte unter 0.10.

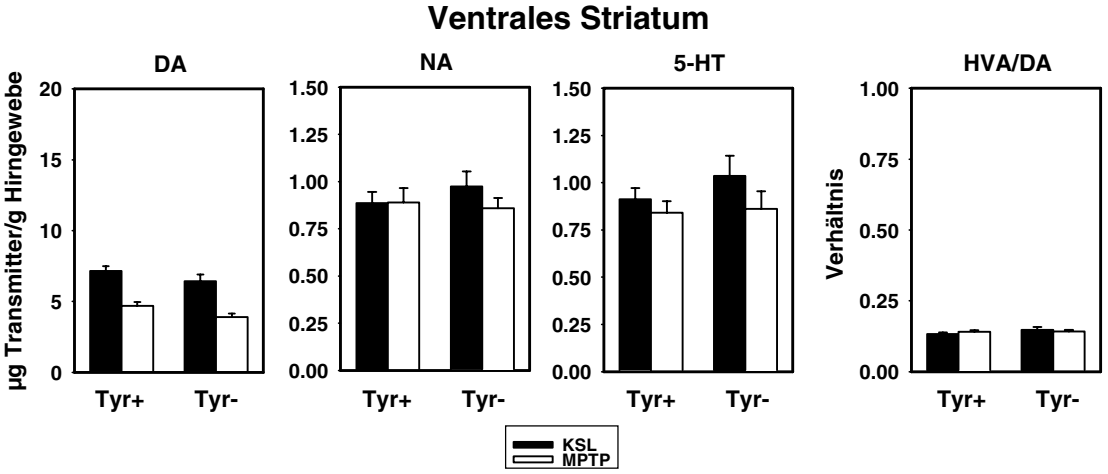

Abb. 55. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im ventralen Striatum. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für Männchen der Mausstämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP4x15 (weiße Balken) erhalten hatten (n=47).

Frontalkortex (Abb. 56)

Im Frontalkortex deuten die p-Werte für den Faktor "Behandlung" bei DA ($F_{1,42}$=14.68, p=0.0004), NA ($F_{1,42}$=7.96, p=0.0073) und 5-HT ($F_{1,42}$=16.48, p<0.0002) auf einen generellen Konzentrationsabfall dieser Transmitter nach MPTP-Gabe hin.

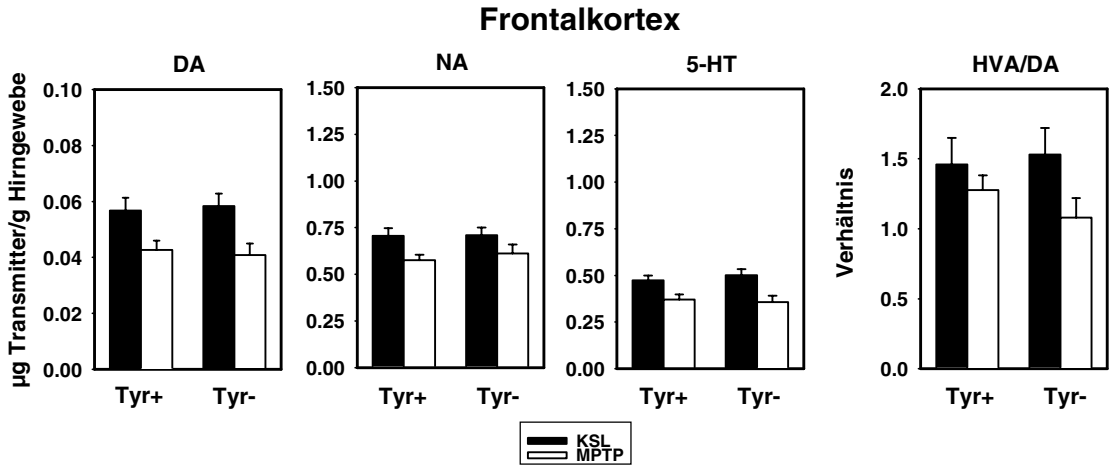

Abb. 56. Konzentration der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT (in µg/g Hirngewebe) sowie das Verhältnis HVA/DA im Frontalkortex. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für Männchen der Mausstämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL, schwarze Balken) oder MPTP4x15 (weiße Balken) erhalten hatten (n=46).

Die DA-Depletionen nach MPTP betrugen 25% (Tyr+) bzw. 30% (Tyr-). Für das Transmitterverhältnis HVA/DA deutete in der ANOVA der Faktor "Behandlung" mit p=0.0508 ($F_{1,42}$=4.04) eine Tendenz für eine Abnahme dieses Quotienten bei MPTP-Behandlung an.

4.5.3.3 Histologie

Die ANOVA für die Zellzahlen in der SN ergab einen signifikanten Behandlungseffekt ($F_{1,43}$=9.19, p=0.0041) im Sinne niedrigerer Zellzahlen nach MPTP, während der Faktor Stamm ($F_{1,43}$=1.22, p=0.2748) und die Interaktion Stamm x Behandlung ($F_{1,43}$=0.44, p=0.5092) nicht signifikant wurden.

Tabelle 22. Mittlere Anzahlen TH-positiver Zellen in der Substantia nigra (SN) und in der Area tegmentalis ventralis (VTA) von Männchen der Mausstämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	Tyr+		Tyr-	
	KSL (n=12)	MPTP (n=12)	KSL (n=11)	MPTP (n=12)
SN	286.6± 8.8	248.6± 16.6	279.6± 13.4	220.1± 22.1
VTA	117.9± 5.2	110.1± 5.4	108.2± 8.8	101.8± 7.1

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der durchschnittlichen Zellzahlen pro Hirnschnitt.

Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Kontroll- und MPTP-Gruppen entsprechen einem Rückgang von 13% beim Stamm Tyr+ und 21% bei Tyr- (Tabelle 22). Bei einer ANOVA für die Zellzahlen in der VTA lagen weder für einen Haupteffekt noch die Interaktion die p-Werte unter 0.10.

4.5.3.4 Letalität

In keinem der beiden Stämme ist ein Tier an den Folgen der MPTP-Toxizität gestorben; die Mortalität betrug also für jede Gruppe 0%.

4.5.3.5 Körpergewicht

Nach MPTP-Behandlung kam es in beiden Stämmen zu einem vorübergehenden Gewichtsverlust, der bei den Mutanten etwas stärker ausfiel (Anhang, Tabelle A-17).

4.5.4 Diskussion

Diese Folgestudie diente dazu, die Bedeutung der Pigmentierung, welche durch den Pigmentfarbstoff Melanin vermittelt wird, für die MPTP-Sensitivität mittels eines Stammvergleichs zwischen dem pigmentierten Stamm C57BL/6 und dessen koisogenem Albinostamm C57BL/6J-*Tyr*$^{c\text{-}2J}$ zu untersuchen. Der zweite Stamm unterscheidet sich vom ersten durch eine Punktmutation im Gen für Tyrosinase, die in der Abwesenheit des Melanin-synthetisierenden Enzyms Tyrosinase resultiert. Das wichtigste Ergebnis dieser Studie ist, daß auf keiner der Betrachtungsebenen (motorische Defizite, striataler Dopaminverlust und nigraler Zellverlust) die Hypothese bestätigt werden konnte, daß der pigmentierte Stamm nach einer MPTP-Behandlung ausgeprägtere Schädigungen aufweisen müßte als der unpigmentierte Stamm.

In unserem Stammvergleich bewirkte die MPTP-Behandlung im Offenfeld Verhaltenseffekte, wie sie auch schon in den vorausgegangenen Experimenten aufgetreten waren, und zwar akute Defäkationsunterdrückung und massive Minderung der lokomotorischen Aktivität an Tag 1; an den darauffolgenden Tagen war die Lokomotion in beiden Stämmen bereits wieder auf Kontrollniveau, teilweise sogar etwas darüber. Im Aufrichtverhalten war grafisch eine leichte Tendenz zu langsamerer Erholung bei Mutanten als bei Wildtyp-Mäusen zu erkennen. Einen etwas deutlicheren Hinweis in diese Richtung erbrachte die Untersuchung des Nestbauverhalten: Hier führte MPTP zu einem leicht verzögerten Nestbaubeginn bei den Tyrosinase-

Mutanten, nicht jedoch bei den Tyrosinase-positiven Tieren. In weiteren Verhaltensparadigmen deuteten sich stammübergreifend MPTP-bedingte Verhaltensänderungen an, namentlich Defizite in Greif- und Pole-Test sowie leicht höhere Offenarmzeiten im Plus-Maze. Dies ist interessant, da auch in den F1- und F2-Generationen eine leichte Tendenz erkennbar war, daß nach MPTP die offenen Arme etwas länger betreten wurden. Sowohl ein KO für DA-D_3-Rezeptoren [403] als auch die Gabe von D_2-Rezeptorantagonisten [347] erhöhen diese Verhaltensweise ebenfalls. Dies läßt die vorsichtige Vermutung zu, daß der DA-Mangel im MPTP-Mausmodell anxiolytisch wirken könnte.

Auf neuronaler Ebene führte MPTP zu Dopaminverlusten in Neostriatum, ventralem Striatum und Frontalkortex; zusätzlich erhöhte sich infolge der Substanzgabe der neostriatale DA-Metabolismus. In allen genannten Maßen gab es die numerische Tendenz, daß Tiere des Stamms Tyr- leicht höhere Veränderungen zeigten als die des Stamms Tyr+. MPTP bewirkte auch einen Verlust von TH-positiven Zellen in der Substantia nigra, der numerisch wiederum höher im Stamm Tyr- ausfiel.
Es kann also zusammenfassend festgestellt werden, daß die Abwesenheit von Melanin-Pigment keinen Schutz vor MPTP-Neurotoxizität bot, sondern daß der verwendete Albinostamm - entgegen der Ausgangshypothese - sogar die Tendenz zeigte, für MPTP eher noch etwas anfälliger zu sein als der koisogene pigmentierte Wildtypstamm. Über den Mechanismus dieses Effekts können nur Vermutungen angestellt werden. Es ist gut bekannt, daß die Aktivität von Tyrosinhydroxylase (TH), welche die DA-Synthese katalysiert, durch MPTP-Behandlung abnimmt [283,407]; vermutlich wird über eine Nitrierungsreaktion die TH inaktiviert [16]. Kürzlich wurde außerdem der Befund gemacht, daß bei Abwesenheit von TH die Katecholaminsynthese auch unter Beteiligung von Tyrosinase erfolgen kann [345]. Es ist demnach denkbar, daß im Wildtyp nach der MPTP-bedingten Verringerung der Anzahl funktionsfähiger TH-Moleküle das Katecholamin Dopamin kompensatorisch mittels Tyrosinase produziert worden ist. Dieser alternative Stoffwechselweg hätte den Tyrosinase-Mutanten nicht zur Verfügung gestanden.

Andererseits gibt es Überlegungen, nach denen Neuromelanin für die Degeneration dopaminerger Neuronen sowohl bei humanem Morbus Parkinson als auch im MPTP-Modell wichtig sein könnte, die auf mehreren Beobachtungen basieren: Bei PD scheint der Verlust nigraler Neuronen mit ihrem Neuromelaningehalt zu korrelieren [220]. Bei Primaten löst MPTP-Gabe ebenfalls bevorzugt die Degeneration pigmentierter Neuronen aus [54,249,250], und in ver-

schiedenen Spezies wurde festgestellt, daß MPP^+ an Melanin und Neuromelanin bindet [90,392]. Nach Modellvorstellungen von D'Amato könnte dieses intraneuronal gebundene MPP^+ allmählich freigesetzt werden, wodurch dessen toxische Wirkung verlängert würde [89]. Unterband man pharmakologisch die Anlagerung von MPP^+ an Neuromelanin (durch kompetitive Hemmung), führte dies im Affen zu verringerter MPTP-Neurotoxizität [88]. Die Verwandtschaft zwischen Melanin und Neuromelanin ist jedoch noch nicht befriedigend geklärt. Es liegen einerseits zwar Hinweise darauf vor, daß beide Melaninformen unter Beteiligung von Tyrosinase synthetisiert werden [339,425], obwohl sich die Substanzen strukturell unterscheiden. Andererseits gibt es aber auch einen nicht-enzymatischen Syntheseweg von Neuromelanin, und interessanterweise ist die SN von Menschen, die eine Albinomutation tragen, dennoch pigmentiert [339]. Dies läßt zumindest die Vermutung zu, daß die beobachtete verringerte MPTP-Anfälligkeit bei Maus-Albinostämmen - so sie denn tatsächlich auf die Tyrosinase-Mutation zurückginge - nicht zwingend mit dem Neuromelaningehalt im Gehirn zu tun haben muß; ein methodisch problematischer Faktor bei dieser Argumentation ist, daß der Neuromelaninnachweis im Gehirn von Nagern schwierig ist.
Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen unseres koisogenen Stammvergleich und denen aus dem etlicher Vergleiche anderer pigmentierter vs. unpigmentierter Stämme (siehe Tabelle 2 in Abschnitt 1.4.5) wäre die Annahme, daß im letzteren Fall nicht das Tyrosinase-Gen, sondern ein auf dem gleichen Chromosom benachbartes Gen, welches in vielen Albinostämmen mit dem Albino-Allel gekoppelt sein müßte, für die Suszeptibilitätsunterschiede verantwortlich war. Damit in Einklang steht, daß es unter diesen Stammvergleichsstudien auch einige Gegenbeispiele gibt, bei denen wie bei uns eher die Albinostämme anfälliger waren [26,46,332]). Deshalb sollte diese chromosomale Region weiter "unter Beobachtung" stehen, denn mit dem rasanten Anwachsen der Information über das Mausgenom könnten hier plausible Kandidatengene entdeckt werden, die wiederum hypothesengeleitet im MPTP-Mausmodell geprüft werden sollten [199].

Schließlich sind die Ergebnisse des vorliegenden Experiments aus methodischer Sicht zu bewerten. Der Vergleich koisogener Stämme ist ein recht scharfer Ansatz, um von einem Gen auf seine Funktion zu schließen. Er ist dem Vergleich eines KO mit seinem Wildtyp ähnlich, aber wenn die koisogenen Stämme durch eine definierte Punktmutation aus dem Ausgangsstamm entstanden sind, entfällt das methodische Problem flankierender Gene aus dem Hintergrundstamm, die beim Knockout-Ansatz die Nullmutation umgeben [163]. Es ließe sich aber auch bei koisogenen Linien die in Bezug auf KO oft diskutierte Kritik anbringen, daß das

Vorhandensein der Mutation bereits ab der Embryonalentwicklung zu Kompensation durch andere Gene führen kann [85]. Als weiterer Kritikpunkt wäre zu nennen, daß die Linie Tyr- bereits vor 30 Jahren aus der C57BL/6-Wildtyp-Linie entstanden ist. Es ist fast sicher davon auszugehen, daß sich während dieser Zeit in den beiden Linien einige weitere Mutationen ereignet und durchgesetzt haben, die aber nicht bekannt sind, weil sie phänotypisch nicht offen erkennbar sind [125]. Prinzipiell ließe sich durch regelmäßige Rückzüchtung dieses Problem lösen. Da uns jedoch keine Dokumentation zugänglich war, inwieweit der Lieferant der Tiere, das Jackson Laboratory, dies tatsächlich durchführt, könnten neben der Tyrosinase-Mutation weitere genetische Unterschiede vorgelegen haben. Aus dieser Sicht wäre es präziser, nur von kongenen Stämmen zu sprechen, also Stämmen, die sich nur in einer sehr begrenzten Zahl von Genen unterscheiden [264]. Es ist allerdings bei einer geschätzten Zahl von 30000-80000 Genen im Mausgenom [13] und angesichts der begründeten Vermutung, daß die Eigenschaft "MPTP-Suszeptibilität" so wie andere schon untersuchte Phänotypen auch durch eine einstellige oder kleine zweistellige Zahl von QTL erklärbar ist (siehe z.B. [82,122,340,444]), rein rechnerisch nicht sehr wahrscheinlich, daß selbst beim Auftreten mehrerer solcher möglichen Mutationen davon ausgerechnet eine relevant für den von uns studierten Phänotyp ist.

Abschließend soll noch ein naheliegender Vergleich angesprochen werden, nämlich derjenige zwischen den hier vorliegenden Ergebnissen und denen im Stamm C57BL/6 der Parentalgeneration. Die gleiche MPTP-Dosis erzielte in C57BL/6-Parentaltieren - Tieren, die ja genetisch identisch mit den Tyr+-Mäusen sein sollten - eine mehr als 10 Prozentpunkte höhere Dopamin-Depletion im Neostriatum, besaß dort also eine höhere neurotoxische Effektivität. Denkbare Erklärungen sind die unterschiedlichen Vorgeschichten dieser Tiergruppen, eine möglicherweise doch nicht völlige genetische Übereinstimmung (siehe oben; es ist tatsächlich auch dokumentiert, daß der gleiche Stamm von unterschiedlichen Lieferanten verschieden MPTP-suszeptibel sein kann [189,396]) oder Faktoren, die die Reproduzierbarkeit von Testergebnissen über Experimente hinweg beeinflussen können (siehe dazu Kapitel 5). Eine erfreuliche Konsistenz der Ergebnisse über unsere Experimente hinweg ist auf der anderen Seite aber daran abzulesen, daß die Mäuse des Stamms Tyr- bei vergleichbar hoher neostriataler DA-Minderung wie bei den C57BL/6-Parentaltieren auch einen prozentual sehr ähnlich hohen Zellverlust aufwiesen.

4.6. Folgeuntersuchung 2: Letalität

4.6.1 Einleitung

Wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, trat in der F2-Generation unter den Weibchen beider Teilkreuzungen eine hohe Letalität infolge der Behandlung mit MPTP auf, während Männchen praktisch gar nicht betroffen waren. Weil Letalität jedoch sowohl unter methodischen Aspekten - sie führt zu einer selektierten Stichprobe - als auch unter Tierschutzgesichtspunkten ein Problem darstellt, wurde weiter versucht, mögliche Ursachen dafür aufzudecken.

Eine pathologische Untersuchung von vier F2-Weibchen hatte ergeben, daß ein perivaskuläres Ödem vermutlich zum Tod geführt hat. Da in unseren F2-Kreuzungen nur ein Männchen eindeutig an den Folgen von MPTP gestorben ist und dies vor Beginn unserer Überlegungen, pathologische Untersuchungen durchzuführen, geschehen war, konnte nur ein einziges Männchen nach der gleichen Methode untersucht werden. Todesursache war bei diesem Tier eine unbeabsichtigte Herzpunktion, die bereits vor der 2. MPTP-Injektion zum Tod geführt hat. Zwar wurden bei diesem Tier keine Anzeichen eines Lungenödems gefunden, aber das erlaubt natürlich keine Aussage darüber, inwieweit Männchen nach MPTP-Behandlung ein solches Ödem entwickeln können und welchen Beitrag diese Pathologie bei ihnen z.B. bei der in der Parentalgeneration sporadisch aufgetretenen Letalität spielt.

Bei unserer unsystematischen Beobachtung der F2-Weibchen gewannen wir den Eindruck, daß manche Tiere auch in frühen Phasen der MPTP-Behandlung wenig beeinträchtigt erschienen, andere dagegen so stark, daß ihr bevorstehender Tod vermutet werden konnte. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, daß auch die Letalitätskomponente der MPTP-Wirkung genetisch moderiert wird. Da jedoch die Geschlechter so frappierende Unterschiede aufwiesen, wurde in Erwägung gezogen, daß möglicherweise auch hormonelle Einflüsse von Bedeutung sind. Hierbei war auch die Beobachtung interessant, daß drei der vier pathologisch untersuchten Weibchen sich in der gleichen Phase des Östruszyklus befanden, nämlich im Östrus. Dieser Zyklus dauert bei weiblichen Mäuse ca. 4 Tage, und in seinem Verlauf ändert sich u.a. die Plasmakonzentration des Hormons Östrogen [182]. Eine der physiologischen Wirkungen von Östrogen ist die Förderung der Wassereinlagerung ins Gewebe [182]. Die lokale Extremform einer solchen Wassereinlagerung ist ein Ödem; in bestimmten Zyklusphasen könnte also die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Ödemen begünstigt sein. Von diesen Überlegungen ausgehend, wurde hypothetisiert, daß die Letalität vom zyklusbedingten Östrogenspiegel abhängen kann. Diese Annahme sollte experimentell überprüft werden, indem MPTP gezielt bei weiblichen Mäusen im Östrus (höherer Östrogenspiegel) vs. Diöstrus (niedrigerer Östrogen-

spiegel) gegeben wurde. Letalität sollte dann bei einer Behandlung während des Östrus mit größerer Wahrscheinlichkeit auftreten als während des Diöstrus.

4.6.2 Durchführung

Insgesamt 11 Weibchen des Stammes C57BL/6 im Alter von 8 bis 10 Wochen wurden in diesem Experiment untersucht. Die Wahl fiel auf diesen Inzuchtstamm anstelle von F2-Tieren, weil letztere Gruppe genetisch heterogen ist und so die Gefahr bestanden hätte, daß dies bei Vorhandensein auch genetischer Einflüsse angesichts der verwendeten kleinen Stichprobengröße das Ergebnis verzerren könnte. Der Versuchsablauf unterschied sich in mehreren Punkten von den bisher dargestellten Experimenten: Am späten Nachmittag vor dem Experimentaltag wurde bei einer größeren Anzahl von Weibchen in der Tierhaltung der TVA ein Vaginalabstrich vorgenommen. Dieser wurde angefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Die zelluläre Zusammensetzung dieses Abstriches erlaubt die Feststellung des Zyklusstadiums [179]. Anhand dieser Ergebnisse wurde eine Vorauswahl von Tieren getroffen, die am nächsten Morgen voraussichtlich in der Östrus- oder Diöstrusphase sein würden. Da jedoch der Vaginalabstrich einen Eingriff darstellt, der den Zyklusverlauf beeinflussen könnte, wurde diese Untersuchung zur Sicherheit am Morgen des Experimentaltages mit den gewählten Tieren wiederholt. Die gesamte Zyklusdiagnostik wurde von Frau Dr. Brumloop (TVA) und ihren Mitarbeiterinnen durchgeführt. Wegen des hohen Zeitaufwandes erfolgten die anschließenden MPTP-Behandlungen mit etwa drei Stunden Verspätung (verglichen mit der Tageszeit der Behandlung in Parental-, F1- und F2-Generation), und aus diesem Grund wurde auch auf ein Händeln der Tiere verzichtet. Je fünf Weibchen im Östrus und im Diöstrus wurden mit der üblichen Dosis MPTP4x15 behandelt. Die Tiere wurden danach der Standard-Verhaltenstestprozedur für den ersten Versuchstag gemäß dem Schema in Abb. 5 unterzogen. 24 Stunden nach Beginn der Behandlung wurde überprüft, welche Tiere gestorben waren bzw. welche die Behandlung überlebt hatten. Am Leben gebliebene Tiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, und alle Tiere wurden für eine nachfolgende pathologische Standarduntersuchung mit Formalin fixiert.

4.6.3 Ergebnisse

4.6.3.1 Verhalten

Tabelle 23 gibt die Mittelwerte und Standardfehler der Offenfeld-Parameter zurückgelegte Distanz, Anzahl von Aufrichtungen und Defäkation getrennt nach den beiden Versuchsgruppen wieder. Der höhere Gruppenmittelwert der Diöstrusgruppe für die zurückgelegte Distanz relativiert sich durch die Tatsache, daß ein Tier einen deutlich höheren Wert hatte als alle anderen Tiere; der Median für diesen Parameter beträgt für die Östrusgruppe 178.8 cm, für die Diöstrusgruppe 170.5 cm. Bei keinem Tier trat im Offenfeld Defäkation auf.

Tabelle 23. Offenfeldparameter von Weibchen, die eine Behandlung mit MPTP4x15 entweder im Östrus oder im Diöstrus erhalten hatten. Die Messung erfolgte eine Stunde nach der letzten Injektion und dauerte 10 Minuten. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler.

	Östrus (n=5)	Diöstrus (n=5)
zurückgelegte Distanz (cm)	185.7±65.2	754.8±623.0
Gesamtdauer der Aufrichtungen (s)	3.6±2.3	3.7±3.7

Im Greif-Test erreichte keines der 10 Tiere die Plattform. Kein Tier konnte sich im Rotarod länger als 12 s auf der Walze halten, und nur ein einziges Tier (dieses war im Östrus behandelt worden) erreichte im Pole-Test den Boden innerhalb von 120 Sekunden. Nennenswerte Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen waren insgesamt nicht zu verzeichnen.

4.6.3.2 Letalität und Pathologie

Innerhalb von 24 Stunden ist kein einziges Tier an den Folgen der MPTP-Behandlung gestorben, weder in der Östrus- noch in der Diöstrusgruppe. Gemessen an dem augenscheinlich vitalen Zustand aller 10 Tiere zu diesem Zeitpunkt wäre auch in den darauffolgenden Tagen aller Wahrscheinlichkeit nach keine MPTP-bedingte Letalität eingetreten. Alle 10 Tiere wurden daher durch zervikale Dislokation getötet. Bei der nachfolgenden pathologischen Untersuchung wurde bei zwei Tieren im Östrus und bei einem Tier im Diöstrus eine leichte Lungenödembildung gefunden.

4.6.4 Diskussion

Entgegen unserer Hypothese ist keines der Tiere aus der Östrusgruppe gestorben. In der Parentalgeneration waren 3 von 14 MPTP-behandelten C57BL/6-Weibchen gestorben, was einer Mortalitätsrate von ca. 21% entspricht. Wenn man annimmt, daß die Letalität zufällig einzelne Tiere betrifft, hätte in der aktuellen Untersuchung bei etwa einem Tier Letalität auftreten sollen. Wegen der geringen Stichprobengröße läge es dann im wahrscheinlichen Bereich, daß gar kein Tier stirbt. Geht man hingegen von der Hypothese aus, daß regelhaft diejenigen Tiere sterben, die zur Zeit der Behandlung einen hohen Östrogenspiegel haben, wäre ein Auftreten von Letalität in der Östrusgruppe schon zu erwarten gewesen.

Erstaunlicherweise gibt es praktisch keine Literatur zum Plasma-Östrogen-Gehalt in Abhängigkeit von der Zyklusphase in der Maus [27], was möglicherweise auf methodische Probleme zurückzuführen ist [24]. Deswegen gingen wir bei der Planung des Experiments aufgrund der funktionellen Bedeutung von Östrogen bei der Eizellreifung [182] davon aus, daß das Östrogen-Konzentrationsmaximum im Östrus erreicht wird (siehe auch [359]). Bei weiblichen Ratten ist jedoch beobachtet worden, daß dieses Maximum schon im Proöstrus (der Phase, die dem Östrus vorausgeht) erreicht wird [218]. Nimmt man an, daß die Zyklus-Mechanismen bei Ratten und Mäusen vergleichbar wären, könnte die Behandlung im Östrus also etwas zu spät erfolgt sein, um eine massive Wechselwirkung zwischen Östrogen und MPTP hervorzurufen. Dazu würde die Tatsache passen, daß wir die untersuchten Tiere der F2-Generation im Östrus tot gefunden haben, so daß diese möglicherweise im Proöstrus behandelt worden waren.

Angesichts der unerwarteten völligen Abwesenheit von Letalitätseffekten in dieser Studie muß auch in Betracht gezogen werden, daß in der Folgestudie die MPTP-Wirkung schwächer ausgefallen sein könnte. Das Neurotoxin war in beiden Studien von derselben Firma bezogen worden und auf die gleiche Weise abgewogen und gelöst worden. Allerdings haben wir die Reinheit der einzelnen verwendeten Chargen nicht überprüft; über etwaige Qualitätsschwankungen liegen uns keine Informationen vor. Im Gegensatz zu den Parentaltieren, die von Frau Dr. Katja Hofele behandelt worden waren, sind die Injektionen in der Letalitätsuntersuchung von Marco Sedelis durchgeführt worden. Es ist daher - trotz sorgfältiger Abstimmung - nicht völlig auszuschließen, daß zwischen den beiden Experimentatoren minimale prozedurale Unterschiede im Injektionsvorgang bestanden haben könnten, die ihrerseits dazu geführt haben könnten, daß in dieser Folgestudie im Mittel eine geringere Menge MPTP toxisch wirksam geworden wäre. Die Verhaltensdaten zeigen jedoch, daß akut deutliche motorische Defizite aufgetreten sind, die ähnlich ausgeprägt waren wie bei den Parentaltieren; dies läßt die Vermutung zu, daß in beiden Studien wahrscheinlich nicht wesentlich verschiedene Mengen

MPTP in den Körper eingebracht worden sind. Ein weiterer Faktor, in dem sich die beiden Experimente unterschieden, ist die Tatsache, daß in der Letalitätsstudie die MPTP-Behandlung tageszeitlich mehrere Stunden später erfolgt ist; eine mögliche Beziehung des Tag-Nacht-Rhythmus zum Letalitätspotential von MPTP ist jedoch rein spekulativ.
Hinsichtlich unserer Hypothese kann natürlich auch kritisch eingewendet werden, daß die beobachtete Konstellation, bei der sich drei von vier F2-Tieren in der gleichen Zyklusphase befanden, auch rein zufällig zustande gekommen sein könnte[8] so daß unserer formulierten Hypothese nicht zwingend ein kausaler Zusammenhang zugrunde liegen müßte. Die diskutierten Probleme lassen insgesamt aber keine eindeutige Bewertung der Fragestellung zu, so daß trotz unseres Negativergebnisses die Annahme eines Zusammenhangs zwischen Letalität und Östrogenwirkung noch nicht völlig verworfen werden sollte. Die frappierenden Geschlechtsunterschiede hinsichtlich der Letalität in der F2 und die Variation dieses Phänotyps über mehrere Generationen hinweg lassen Raum für Spekulationen, inwieweit komplexe Interaktionen von Genen und Hormonen (siehe dazu [325]) dafür verantwortlich sein könnten.

Es wäre deshalb interessant, die Problematik in zukünftigen Untersuchungen eingehender zu untersuchen. Da unser Experiment von vornherein nur explorativen Charakter hatte, wurde auf eine exakte Messung der Plasma-Östrogenkonzentrationen aus ökonomischen Gründen bewußt verzichtet. In weiteren Vorhaben sollte ein derartiges Meßverfahren - trotz des dazu nötigen hohen methodischen Aufwandes [24] - jedoch verwirklicht werden, damit eine eindeutige Zuordnung möglicher Letalitätseffekte zu Hormonkonzentrationen möglich ist. Als weitere Maßnahme wäre eine Erhöhung der MPTP-Dosis zu erwägen, um Letalität zu forcieren. Eine methodische Abwandlung läge in einer Zyklus-Synchonisierung, die durch gezielte Hormongabe erreicht werden könnte; dieser Ansatz böte den methodischen Vorteil, daß man die Tiere so behandeln könnte, daß ein zeitlich besser definierter Versuchsplan (wie in den Untersuchungen der Parental-, F1- und F2-Generationen) möglich wäre. In diesem Zusam-

[8] Unter den stark vereinfachenden Annahmen, daß der Zyklus aus vier gleich langen und gleich gut diagnostizierbaren Phasen besteht, daß der Zyklus in einem Tier unabhängig von dem anderer Tiere ist und daß *kein* Zusammenhang zwischen Letalität und Zyklusphase existiert, beträgt die Wahrscheinlichkeit, bei vier untersuchten Tieren zufällig drei in der gleichen Zyklusphase auszuwählen:

$$p = \binom{4}{3} \times 0.25^3 \times 0.75 = 0.047.$$

Dieses Ereignis hat also eine Wahrscheinlichkeit von knapp 5%. Allerdings ist bekannt, daß der Zyklus von Mausweibchen bei Anwesenheit von Männchen synchronisieren kann, vermutlich über Pheromone vermittelt [159]; da in unseren Experimenten beide Geschlechter im gleichen Raum gehalten wurden, ist es also möglich, daß die obige Schätzung noch deutlich zu niedrig liegt.

menhang wäre schließlich auch interessant, ob bei Männchen, wenn diese mit Östrogen behandelt würden, die Letalität auf das Niveau von Weibchen anstiege.

5 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

In der vorgestellten Experimentreihe wurde das Ziel verfolgt, Auswirkungen des Neurotoxins MPTP auf Verhaltens- und neurale Maße in Abhängigkeit von der genetischen Ausstattung der untersuchten Tiere zu studieren. Hierbei lassen sich drei Abschnitte unterscheiden: In einer kleinen Vorstudie wurden als Orientierungshilfe Informationen über diese Maße in unbehandelten Tiere gesammelt. Das Kernstück der Untersuchungen bildeten drei aufeinanderfolgende Generationen, in denen der Phänotyp in Gruppen mit unterschiedlicher genetischer Struktur beobachtet werden konnte. Daran schlossen sich zwei Folgestudien an, in deren Mittelpunkt die Bedeutung eines einzelnen Gens für die MPTP-Neurotoxizität bzw. der Einfluß von hormonellen Schwankungen auf das letale Potential von MPTP standen.

In diesem Kapitel sollen drei Themenkreise erörtert werden: Erstens werden mehrere Ergebnisse nochmals aufgegriffen und Experiment-übergreifend diskutiert. Zweitens sollen einige methodische Fragen angesprochen werden, die für die Gesamtheit der vorgestellten Experimente relevant sind, sich jedoch nicht immer vom ersten Punkt abgegrenzt darstellen lassen. Abschließend werden die Ergebnisse unserer Arbeit hinsichtlich ihrer Bedeutung für die weitere Suche nach Parkinsonismus-relevanten Genen betrachtet und Vorschläge gemacht, wie die von uns gemachten Erfahrungen in die Konzeption zukünftiger diesbezüglicher Studien einfließen könnten.

Methodische Aspekte von Längsschnittbetrachtungen

Betrachtet man die erhobenen Parameter über die Serie von Experimenten hinweg, lassen sich einige markante Trends erkennen. Als Beispiele aus dem Verhaltensbereich seien genannt, daß die Offenfeld-Defäkation in nahezu allen Experimenten bei Testwiederholung anstieg oder die Rotarodleistung sich mit wiederholter Testdarbietung verbesserte. Auch hinsichtlich der Effekte von MPTP gab es einige Beobachtungen, die konsistent beobachtet wurden: In allen Gruppen kam es zumindest am Tag der Behandlung zu drastischem Aktivitätsrückgang und Unterdrückung der Defäkation, in sämtlichen Versuchsgruppen war im Mittel ein neostriataler Dopaminverlust zu verzeichnen, und dieser war stets höher als der Dopaminverlust im ventralen Striatum. Es handelte sich also um sehr stabile Effekte, die stamm- und geschlechtsübergreifend und teilweise selbst trotz Variation von Haltungs- und Testbedingungen (Vorversuch) regelhaft auftraten. Auf der anderen Seite lassen sich in der Zusammenschau der Experimente Parameter benennen, die von Generation zu Generation große Änderungen aufwiesen. So variierten MPTP-Effekte z.B. hinsichtlich des Ausmaßes des neostriatalen Dopaminverlustes, des nigralen Zellverlustes und der funktionellen Erholung von Lokomotion und

Nestbauverhalten zwischen Stämmen, Generationen und Geschlechtern. Unterschiede zwischen Generationen wurden dabei als Folge der veränderten genetischen Ausstattung interpretiert, da genau dieser Generationenvergleich ja im Mittelpunkt unserer Untersuchungen stand. Es soll hier jedoch auf die damit verbundenen Probleme hingewiesen werden: Beispielsweise lagen die striatalen DA-Konzentrationen bereits in den Kontrollgruppen der F1-Generation höher als bei den Parentaltieren, so daß ein direkter Vergleich der absoluten Werte nach MPTP-Behandlung nicht sinnvoll wäre. Als Lösung wurden Vergleiche mittels der relativen Werte, bezogen auf die jeweiligen Kontrollgruppen, durchgeführt (Depletionen); auf die potentiellen Schwierigkeiten dieses Vorgehens in der F2-Generation wurde dort in der Diskussion bereits hingewiesen.

Ferner erstreckten sich unsere Studien über einen Zeitraum von mehr als zwei Jahren, in denen die Generationen sukzessive untersucht wurden. Obwohl auf eine bestmögliche Konstanz der Versuchsbedingungen geachtet wurde, kann diese nicht vollständig garantiert werden; Fehlerquellen könnten bei uns z.B. Betreuung der Tiere durch wechselnde Tierpflegerinnen in der TVA, durch einen neu hinzugekommenen Experimentator ab der F2-Generation, Qualitätsschwankungen verwendeter Produkte wie des Neurotoxins oder analytischer Chemikalien dargestellt haben. Es ist darüber hinaus gezeigt worden, daß physiologische Parameter bei Labortieren trotz kontrollierter, gleichförmiger Haltung jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen können, was sich auf die pharmakologische Wirkung mancher Substanzen auswirken kann (Übersicht bei [269]). In dieser Arbeit angestellte Generationenvergleiche müssen daher unter diesem Vorbehalt interpretiert werden; andererseits sei darauf verwiesen, daß solche Vergleiche wissenschaftliche Gepflogenheit in der (Verhaltens-)Genetik sind (siehe z.B. die umfangreiche Übersicht von Phelan [326]).

Ein weiteres methodisches Problem lag darin, daß die Tiere in unseren Experimenten mehreren Testverfahren in der gleichen Reihenfolge ausgesetzt waren. Nicht ausgeschlossen werden können dadurch Reihenfolge-Effekte [72] in der Weise, daß eine Testerfahrung das Ergebnis später durchgeführter anderer Testverfahren verändern könnte. Daher müssen alle Befunde unter dem Vorbehalt betrachtet werden, daß daraus abgeleitete Aussagen spezifisch für unser Versuchsdesign sein könnten. Theoretisch hätte eine Randomisierung der Testabfolgen einen Ausweg aus diesem Problem dargestellt; praktisch wäre dies jedoch hinsichtlich Ökonomie und Tierschutz nicht realisierbar, da hierfür bei den von uns vorgenommenen sechs Verhaltenstests und mehrfacher Testung in jedem Paradigma immense Tierzahlen erforderlich wären.

Eignung von phänotypischen Markern

Eine entscheidende Frage unserer Untersuchungen war festzustellen, welche(s) der erhobenen Maße für die anvisierte QTL-Analyse zweckmäßig sein würde(n). Wie in Abschnitt 3.8 erläutert, wurde bereits bei Beginn der Experimente vermutet, daß die drei Maße "Lokomotion im Offenfeld", "neostriataler DA-Gehalt" und "Anzahl nigraler TH-positiver Zellen" wahrscheinlich gute Indikatoren für MPTP-bedingte (differentielle) Effekte sein würden. Sie repräsentieren darüber hinaus auch unterschiedliche Betrachtungsebenen, auf denen die humane Parkinson-Krankheit regelmäßig beschrieben wird. Die Offenfeld-Lokomotion liefert dabei einen Indikator für die Ausprägung von Akinesie, einem zentralen motorischen Symptom bei PD, und da sie sich in der Vergangenheit auch als gut geeignet erwiesen hat, um die Effektivität von neuroprotektiven/-restaurativen Behandlungen im MPTP-Mausmodell nachzuweisen (siehe Tabelle 1), wurde sie als brauchbar für Stammvergleiche in Hinblick auf differentielle Defizite eingeschätzt und daher an den Anfang unserer Testbatterie gestellt.

Diese Einschätzungen haben sich insofern als richtig erwiesen, als im Vergleich der beiden Parentalstämme tatsächlich alle drei Indikatoren gleichförmig den Stamm C57BL/6 als den stärker MPTP-anfälligen Stamm auswiesen. Ferner schien für das Verhaltensmaß der Tag 2 am besten geeignet zu sein, um zwischen den beiden Stämmen, die sich zu diesem Zeitpunkt unterschiedlich gut erholt hatten, zu differenzieren. Im Kontrast dazu war zu diesem Zeitpunkt in beiden Teilkreuzungen der F1-Generation die funktionelle Erholung bereits relativ abgeschlossen, und auch Zellverluste waren in dieser Generation nicht vorhanden, so daß sich die Ergebnisse in diesen beiden Parametern, in denen sich eine MPTP-Wirkung nur sehr kurzfristig bzw. gar nicht nachweisen ließ, nicht von denen der Balb/c-Tiere unterschieden. Daran gemessen, kann maximal ausgesagt werden, daß die F1-Generation nicht anfälliger für MPTP ist als der resistente BALB/c-Stamm, jedoch nicht, ob die F1-Tiere eventuell sogar noch resistenter sind. Diese Konstellation setzte sich in der F2 fort. Über den Zellverlust in der F2 können bislang nur Vermutungen angestellt werden, aber ein deutlicher Verlust (das bedeutet, auch mit genotypischen Markern korrelierbarer Zellverlust) ist dort ebenfalls nicht zu erwarten. Hinsichtlich des Verhaltens böte auch die alternative Betrachtung des Aufrichtverhaltens als eines offenbar ebenfalls MPTP-sensitiven Parameters (siehe Parental- und Tyrosinase-Tiere) nicht genügend zusätzliche Information und scheint nicht eindeutig mit der neuralen Schädigung gekoppelt zu sein (siehe F1- und F2-Generation).

Für die Konzentration von DA im Neostriatum war dagegen in allen MPTP-Gruppen ein klarer Konzentrationsrückgang gegenüber den Kontrollen zu verzeichnen, so daß alle untersuchten Gruppen aller Generationen in eine eindeutige Rangreihe bezüglich ihrer MPTP-

Suszeptibilität gestellt werden können. Aus dieser Sicht kann die striatale DA-Konzentration (bzw. ihre Normalisierung, die Depletion) für unseren Stammvergleich als bester Parameter betrachtet werden - und damit auch als einzig vielversprechender für eine QTL-Analyse der MPTP-Suszeptibilität.

Die Tatsache, daß voraussichtlich zwei der drei anvisierten phänotypischen Marker nicht genutzt werden können, war anhand der Daten in der Parentalgeneration nicht vorhersagbar, da keinerlei Voraussage möglich war, daß sich die Mittelwerte der Phänotypen in der F1-Generation in Richtung starker Resistenz verschieben würden; als Gegenbeispiel sei die Studie von Hamre et al. [184] genannt, in der bei einer anderen F1-Kreuzung eine Verschiebung in Richtung *geringerer* MPTP-Resistenz stattgefunden hat. Die hohe Resistenz in unserer F1- und auch der F2-Generation führt in ein Dilemma: Es wäre im Rückblick wünschenswert gewesen, in der Parentalgeneration mit einer höheren MPTP-Dosis als MPTP4x15 begonnen zu haben; dies hätte vermutlich in der F1-Generation zu stärkeren Läsionseffekten geführt. Wie die anfänglichen Dosisfindungsexperimente aber demonstriert haben, bestand eine Gratwanderung zwischen erwünschter Neurotoxizität und unerwünschter Letalität, so daß eine höhere Dosis bei unseren beiden Stämmen und Geschlechtern aus dieser Sicht nicht möglich war. Eine Erhöhung der MPTP-Dosis erst nach der Parentalgeneration wäre aber auch nicht sinnvoll, weil dann keinerlei Generationenvergleich mehr möglich wäre. Die innere Logik der QTL-Methode verbietet es quasi, in der Parentalgeneration getroffene Entscheidungen später zu korrigieren.

Bandbreite von Läsionsindikatoren

Die geschilderte Konstellation für die Maße "Lokomotion" und "nigrale Zellzahlen" verdeutlicht, daß diese weniger empfindlich auf eine MPTP-Gabe reagieren als das neurochemische Maß der striatalen DA-Konzentration und daher nicht zwischen Gruppen differenzieren können, die nach MPTP-Gabe nur mäßige Defizite zeigen. Dies steht im Zusammenhang mit dem Charakteristikum des nigrostriatalen Systems, daß erst oberhalb einer Schwelle von ca. 80% DA-Verlust längerfristige motorische Symptome evident werden (zu den dahinterliegenden Mechanismen s.u. "Funktionelle Erholung"). Dieser Schwellenwert (als grober Richtwert) scheint auch für Mäuse zu gelten [111,181,192] und würde verhindern, daß deutliche Verhaltensausfälle in den meisten der von uns untersuchten Gruppen zu finden sind. In der Tat sind solche vornehmlich in denjenigen Gruppen aufgetreten, die eine DA-Depletion ab 80% hatten (C57BL/6 und Tyr-). Ähnliches gilt für nigralen Zellverlust, der auch erst einzutreten scheint, wenn die einwirkenden Noxen ein bestimmtes Maß überschreiten; bei uns waren Zellverluste

beispielsweise nur in Gruppen mit Depletionen über 70% zu finden. Aus dieser Sicht schien es bei unseren Kreuzungen also vorprogrammiert (wenn auch nicht vorhersagbar), daß diese erst bei stärkerer Läsion greifenden Parameter in unseren relativ resistenteren F1- und F2-Generationen nicht aussagekräftig sein würden.

Beziehung zwischen Letalität und Neurotoxizität

Sowohl die letale als auch die neurotoxische Wirkung von MPTP gelten als dosisabhängig [70,136,470]. Darüber hinaus stellt sich deren Verhältnis zueinander jedoch sehr verwickelt dar: Während wir keinen deutlichen Letalitätsunterschied zwischen den beiden Parentalstämmen fanden, waren in einem anderen Stammvergleich [184] die neurotoxische und letale Wirkung von MPTP positiv korreliert. Spätestens ab unserer F2-Generation wurde aber deutlich, daß diese Wirkungen geschlechtsabhängig dissoziieren können, was in der Parentalgeneration nicht beobachtet wurde. Dies legt die Vermutung nahe, daß eine genetische Komponente für die Letalität von Bedeutung ist. Da wir auch von den gestorbenen Tieren DNS-Proben entnommen haben, wäre es vielversprechend, den Phänotyp "Letalität" QTL-analytisch zu untersuchen, um eventuell nähere Aufschlüsse über die Natur der toxischen Wirkung von MPTP zu erlangen.

Pigmentierung

Bezüglich des Einflusses von Melanin auf die MPTP-Neurotoxizität ergaben unsere Studien insgesamt ein heterogenes Bild: Die Konstellation in unserer Parentalgeneration stimmte mit früheren Beobachtungen anderer Autoren überein, nach denen pigmentierte Tiere anfälliger sein sollten als unpigmentierte. In der F2-Generation fand sich dieser Trend nur bei Männchen und dort wiederum nur in einer der beiden Teilkreuzungen. Die Befunde mit dem methodisch sicher aussagekräftigsten Verfahren in unserer Experimentreihe, nämlich dem separaten Vergleich von koisogenen Stämmen mit einem Unterschied allein im Albinismus verursachenden Gen, sprachen schließlich eher gegen die Melaninhypothese. Dennoch könnte die Albinomutation bei anderen Albinostämmen (nicht jedoch bei unserem durch Punktmutation entstandenen C57BL/6-Mutantenstamm) mit einem benachbarten Resistenz-Gen gekoppelt sein; diese Möglichkeit sollte jedenfalls bei weiteren Untersuchungen nicht völlig vernachlässigt werden. Interessant wären Informationen über die Auftretenshäufigkeit von PD bei humanen Albinos, die unseres Wissens jedoch nicht verfügbar sind; allerdings scheint bei Menschen nach neueren Studien das Auftreten der Parkinson-Krankheit nicht eindeutig mit heller

oder dunkler Hautfarbe, d.h. unterschiedlichen Graden an Melaninproduktion, assoziiert zu sein [284].

Funktionelle Erholung

In den Einzeldiskussionen war an vielen Stellen der Terminus "funktionelle Erholung" verwendet worden. Hiermit wurde die Verbesserung von Verhaltensweisen, deren Ausprägung infolge der Neurotoxingabe zunächst defizitär war, zurück zum Niveau von Kontrolltieren bezeichnet. Dies ist ein Prozeß, der sich bei vielen Tieren erstaunlich rasch vollzog, selbst in unserer am stärksten lädierten Gruppe mit 85% DA-Depletion und 25% Zellverlust. Betrachtet man diese Gruppe, stellt sich die Frage, welche Mechanismen es Tieren mit derart ausgeprägten neuronalen Defiziten ermöglichen, nur Tage nach der Behandlung viele Verhaltensweisen offenkundig kaum beeinträchtigt zu vollziehen. Diese Frage kann anhand unseres Datenmaterials nicht geklärt werden. Für die deutliche Reduktion der Lokomotion an Tag 1, in vielen Gruppen gefolgt von einer Normalisierung bereits nach 24 Stunden, könnte beispielsweise die durch MPTP ausgelöste schnelle Freisetzung von DA und damit einhergehende Entleerung von DA-Speichern verantwortlich sein (siehe [98,162,294]), gefolgt von einem partiellen Wiederauffüllen durch Neusynthese. Ohne genaue Kenntnis der DA-Konzentrationen, Syntheseraten etc. während der Erholungsphase kann ein solcher Mechanismus, der eher als direkte Drogenwirkung und deren Nachlassen zu interpretieren wäre, zumindest nicht ausgeschlossen werden. Allerdings wurden auch bei diesen schnell erholten Tieren noch nach einer Woche teilweise hohe DA-Verluste festgestellt, so daß die Frage bestehen bleibt, wie mit verringerter Gesamttransmittermenge z.B. Lokomotion auf Kontrollniveau ausgeübt werden kann. Bereits angesprochen wurde, daß die Erhöhung des Verhältnisses von Metaboliten zu Transmitter als kompensatorische Leistung interpretiert wird; dies fanden wir im übrigen nicht nur für den Metaboliten HVA, sondern in ähnlicher Weise auch für DOPAC und 3-MT (deren Daten aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht zusätzlich präsentiert wurden). Eine derartige Anpassung kann im MPTP-Modell schon innerhalb der ersten Stunden nach Behandlung auftreten [294]. Daneben ist in der Literatur eine Vielzahl anderer Anpassungsmechanismen berichtet worden, die dazu beitragen dürften, die Integrität neuronaler Systeme (z.B. in Form der Homöostase extrazellulärer Transmitterkonzentrationen) soweit aufrecht zu erhalten, daß Verhaltensfunktionen noch effektiv ausgeführt werden können. Diese Prozesse können nach dem Grad ihrer Geschwindigkeit als schnelle oder langsame Adaptationen eingestuft werden [35]. In einer Studie wurde nach Gabe des MPTP-Analogs 2'CH_3-MPTP, welches striatale DA-Reduktionen von über 60% verursachte, z.B. eine erhöhte Feuerungsrate ni-

graler Neuronen gemessen [33]. Eine anderer Mechanismus, der zu funktioneller Erholung beitragen könnte, ist die Möglichkeit, daß die noch ausgeschüttete Menge an Transmittern effektiver genutzt wird, indem sie über eine weitere Distanz diffundiert ("volume transmission" [62,363]). Kürzlich wurde auch eine Zunahme der Anzahl synaptischer Endknöpfe innerhalb von 24 Stunden nach MPTP-Gabe in einem Teil der nigralen Neuronen berichtet, und diese strukturelle Modifikation wurde von den Autoren als kompensatorische Leistung noch intakt gebliebener Neuronen gedeutet [75]. Auf der anderen Seite gibt es Anpassungsvorgänge, bei denen das verfügbare Signal besser "genutzt" wird, z.B. in Form einer erhöhten Anzahl postsynaptischer Rezeptoren; dies kann bereits zwei Tage nach MPTP-Gabe gefunden werden [252,323,456]. Längerfristige Änderungen schließen möglicherweise auch die Herunterregulation der DA-Wiederaufnahme [37] oder das Aussprossen von Fasern verbliebener Neuronen, z.B. auch aus der VTA, ein [196,296]. Solche langsamer ablaufenden neuronalen Veränderungen, die innerhalb von Wochen erfolgen, eignen sich zwar kaum, um die in unseren Tieren beobachteten, wesentlich schneller erfolgenden funktionellen Erholungsprozesse zu erklären; sie könnten allerdings die "schnellen" Kompensationsmechanismen zu einem späteren Zeitpunkt ergänzen oder ablösen. Weitere Erkenntnisse zu Kompensationsprozessen, teilweise an anderen Modellen als dem MPTP-Mausmodell gewonnen, sind in mehreren Überblicksarbeiten nachzulesen [35,371,372,394,471] und sollen deshalb hier nicht weiter referiert werden. Derartige Mechanismen scheinen bei MPTP-lädierten Mäusen äußerst effektiv zu funktionieren, so daß die motorischen Systeme bei Mäusen als sehr adaptativ angesehen wurden [292].

Einige dieser Mechanismen dürften auch bei unseren Mäusen dafür verantwortlich sein, daß Verhaltensausfälle nach MPTP-Gabe nur sehr kurzfristig zu beobachten waren. In der F2-Generation trat der Effekt zutage, daß die Tiere nach einigen Tagen sogar Überaktivität zeigten. Dieses Phänomen ist nicht unbekannt (siehe Tabelle 2) und ist offenbar in den meisten entsprechenden Arbeiten auf exzessive MPTP-Dosen zurückzuführen, die zu Konzentrationssteigerungen von striatalem 5-HT führen können [70]. Da wir eine moderate Dosis verwendeten und bei (von uns selten beobachteten) serotonergen Veränderungen eher eine 5-HT-*Abnahme* im Striatum fanden, dürfte diese Erklärung auf unseren Effekt nicht übertragbar sein. Vorstellbar wäre, daß die leichte Überaktivität durch interagierende Kompensationsmechanismen verursacht wird, z.B. in dem Sinne, daß erhöhter DA-Metabolismus auf eine sich entwickelnde postsynaptische Supersensitivität trifft; da uns jedoch aus unseren Mäusen nur *post mortem* Daten zur Verfügung stehen, bleibt diese Annahme spekulativ.

Nestbauverhalten

Das Nestbauverhalten, das in der vorliegenden Studie wahrscheinlich erstmals im MPTP-Modell untersucht worden ist, hat sich als eine Verhaltensäußerung erwiesen, die sensitiv auf nigrostriatale Defizite reagiert, und dies, obwohl ein recht grobes Maß verwendet wurde, das einen beträchtlichen Teil an zusätzlich gewinnbarer Information vernachlässigt hat. So beobachteten wir, daß bei den C57BL/6-Mäusen, die ja später als BALB/c-Tiere mit dem Nestbau begonnen hatten, nach schließlich begonnenem Nestbau dennoch die *Qualität* der Nester schlechter zu sein schien; einige Autoren haben im Rahmen anderer Fragestellungen erfolgreich Skalen eingesetzt, um die Qualität des Nestbaus zu kategorisieren [51,380,381]. Auch erlaubte unsere in Tages-Intervallen vorgenommene Beurteilung nur eine grobe zeitliche Differenzierung; eine feinere zeitliche Auflösung wäre vielleicht erfolgversprechend, um auch Defizite bei weniger stark lädierten Tieren nachzuweisen. Für Folgestudien wären Verfeinerungen in den genannten Punkten erstrebenswert. Kritisch anzumerken ist schließlich, daß die Versuchsleiter bezüglich der Gruppenzugehörigkeit der von ihnen beurteilten Mäuse nicht blind waren und dadurch das Rating nicht vollständig objektiv gewesen sein könnte; es stünden jedoch sogar relativ objektive Methoden zur Verfügung, mit denen der Nestbau über das Gewicht des verbauten Materials quantifiziert wird [388]. Aus den genannten Gründen wird das Nestbauverhalten von uns als sehr vielversprechend und ausbaufähig für zukünftige Untersuchungen im MPTP-Mausmodell betrachtet. Dies gilt auch unter dem Aspekt, daß Nestbau einerseits zum maustypischen Verhaltensrepertoire gerechnet werden kann und andererseits Forderungen zunehmen, in den Verhaltensneurowissenschaften ökologisch validere Verhaltensweisen zu untersuchen (siehe z.B. [164]).

Vorschläge für zukünftige Studien

Aus den gemachten Erfahrungen und Befunden der vorliegenden Studien lassen sich mehrere Schlüsse ziehen, die von Bedeutung für die Planung nachfolgender Arbeiten sein können.

Beispielsweise hätte die Komplexität unseres gesamten Ansatzes reduziert werden können, indem statt beider Geschlechter nur Männchen untersucht worden wären. Dies hätte zwar die Gültigkeit der QTL-Ergebnisse eingeschränkt, aber andererseits ermöglicht, eine höhere MPTP-Dosierung zu verwenden und so das "Sensitivitätsproblem" bei Verhaltens- und histologischen Maßen wirksam zu bekämpfen. Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch, daß bei der Zucht dann ungewollt große Mengen von nicht benötigten Weibchen produziert würden, was unökonomisch und aus der Tierschutzperspektive nicht wünschenswert wäre.

Eine Möglichkeit, Verhaltensdaten zu gewinnen, die den Erholungsverlauf noch besser widerspiegeln, bestünde sicherlich darin, Offenfelddaten in höherer zeitlicher Auflösung (z.B. Testung alle drei Stunden oder längere Testdauer) zu erheben, besonders an den ersten Tagen. Angesichts der in einigen Gruppen beobachteten überschießenden Erholung böte sich aber auch eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums über eine Woche hinaus an, um zu klären, ob und wann eine Angleichung auf Kontrollniveau erfolgt. Um Informationen über dahinterliegende Mechanismen zu gewinnen, wäre die Erhebung neurochemischer Daten zu verschiedenen Zeitpunkten im Erholungsverlauf sinnvoll.

Interessant wäre auch die Überprüfung der Frage, ob die Parentalstämme sich modellübergreifend in der Anfälligkeit ihres nigrostriatalen Systems unterscheiden; dies könnte z.B. durch intrazerebroventrikuläre Gabe des dopaminergen Neurotoxins 6-OHDA [281] getestet werden. Bliebe das Anfälligkeits-Muster bestehen, wäre dies ein Indiz dafür, daß die Stammunterschiede tatsächlich auf einem unterschiedlich ausgeprägten Potential der dopaminergen Systeme beruhen, auf Noxen zu reagieren, anstatt auf bloßen Charakteristika spezifischer Toxinwirkungen.

Weitere verhaltensneurowissenschaftlich interessante Fragestellungen beziehen sich auf die qualitativen Verhaltensunterschiede zwischen den Stämmen im Pole-Test. Dieser Test war bei C57BL/6-Tieren gut geeignet, um MPTP-bedingte motorische Defizite abzubilden, und dürfte neben der Domäne Akinesie/Bradykinesie (die bereits im Offenfeld erfaßt wird) auch motorische Koordinationsdefizite erfassen. Allerdings setzt der Test, wenn damit sensomotorische Einschränkungen erfaßt werden sollen, eine "Tendenz" der Tiere voraus, die Stange zu verlassen. Eine diesbezüglich gerichtete Verhaltenskette trat in manchen Gruppen kaum auf, was dann eine Interpretation des Verhaltens im Sinne sensomotorischer Einschränkungen verhinderte. Daher wäre es wichtig, die Variablen zu identifizieren, die diese Tendenz beeinflussen: Hier seien exemplarisch Überlegungen genannt, motivationale Faktoren genauer zu studieren, die Bedeutung von Test- und Umweltbedingungen zu prüfen oder die Verhaltensauswirkungen von Anxiolytika oder Substanzen, die Stereotypien auslösen können, zu studieren. Da der vierte Testtag offenbar auch recht gut geeignet scheint, um potentielle "Stangen-Nichtverlasser" unter den Tieren zu identifizieren, könnte diese Kategorisierung auch als phänotypische Variable benutzt werden, um QTL-analytisch bezüglich dieses Verhaltens relevante Genorte einzukreisen.

Fernziel: QTL-Detektion und Genidentifikation

Von besonderem Interesse ist abschließend die Frage, welche Ergebnisse von einer QTL-Analyse der neostriatalen Dopaminkonzentrationen (bzw. Depletionen) in unseren F2-Tieren zu erwarten sind. Allgemein wird erwartet, daß im Generationenvergleich die Variabilität eines Parameters in der Reihenfolge F1 < Parental < F2 zunimmt [20,123,326]. Ein Blick auf Tabelle 16 verrät jedoch, daß unsere F1-Generation die höchsten Variationskoeffizienten für die DA-Depletion besitzt. Es wurde bereits in Kapitel 4.2.4 die Schwierigkeit erörtert, dies zum jetzigen Zeitpunkt schlüssig zu erklären. Die Variationskoeffizienten sind jedoch in der F2-Generation mäßig höher als bei den Parentaltieren - was aufgrund der genotypischen Variabilität in der F2-Generation plausibel und erwünscht ist. Berücksichtigt man ferner, daß ein Teil der phänotypischen Varianz in Inzuchtstämmen interessanterweise *nicht* genetisch bedingt ist und mit der massiven Inzucht zusammenhängt (zu dahinterliegenden Mechanismen siehe [20,326]), dürfte erfreulicherweise der *genetisch* bedingte Variabilitätsabstand der F2- zu den Parentaltieren tatsächlich sogar noch etwas größer sein. Die F2-Generation weist keine maternalen Effekte auf, so daß die Kreuzungen für die Auswertung gepoolt werden können. Allerdings müssen bei den Geschlechtern getrennte QTL-Berechnungen durchgeführt werden; deren Ergebnisse können aber anschließend integriert werden (Pierre Roubertoux, persönliche Mitteilung). Insgesamt ist zu vermuten, daß die Korrelation des phänotypischen Markers "DA-Depletion" (der eine mäßig hohe phänotypische Varianz aufweist) mit den genotypischen Markern die Identifikation einer kleinen Zahl von QTLs ermöglichen wird.

Fernziel wäre anschließend natürlich die Identifikation der Gene selbst (siehe Kapitel 1.5.3). Wenn dies gelänge, zöge dies sicher die Produktion von genetisch manipulierten Tieren nach sich, an denen Parkinsonismus-Merkmale erkennbar sein müßten. Bislang existieren einige wenige Mutanten mit Parkinson-relevanten Merkmalen, die allerdings nur unzulängliche Modelle darstellen, wie die *weaver*-Maus [362,386,428], die AS/AGU-Ratte [60,61,73], die "circling rat" [426] oder DA-D_2-Rezeptor-Knockout-Tiere [15,21]. Das Beispiel α-Synuclein zeigt jedoch eindrucksvoll, daß die Entdeckung neuer Gene sehr rasch aufgegriffen wird und zur Herstellung von Modellorganismen führt [1,279,436], an denen die Funktionsweise der Gene erforscht werden kann. Ein sehr ausgereiftes Modell wären sicherlich induzierbare Knockouts [354] für zukünftig identifizierte Parkinson-Gene, deren Aktivierung in einem frühen Lebensabschnitt in einer Degeneration des nigrostriatalen Systems der Tiere zu einem späteren Zeitpunkt resultieren würde.

Es sollte jedoch nicht übersehen werden, daß alle genannten Schritte in praxi gewaltige Forschungsanstrengungen bedeuten würden. Spacey und Wood [399] stellten 1999 fest: "Sicherlich gibt es wachsende Evidenz für einen genetischen Einfluß in der Ätiologie des Morbus Parkinson. Die genaue Natur des genetischen Mechanismus und sein relativer Beitrag bei der sporadischen Parkinson-Krankheit sind aber noch zu bestimmen[9]." Die vorliegende Arbeit versteht sich als tierexperimenteller Beitrag, um diesem Fernziel möglicherweise ein kleines Stück näher kommen zu können.

[9] Übersetzung durch den Autor (M.S.)

6 Literaturverzeichnis

[1] Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi LD, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 2000, 25:239-252.

[2] Abercrombie ED, Keefe KA, DiFrischia DS, Zigmond MJ. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J Neurochem.* 1989, 52:1655-1658.

[3] Agid Y, Ruberg M, Raisman R, Hirsch E, Javoy-Agid F. The biochemistry of Parkinson's disease. In: Stern GM, ed. Parkinson's disease. London: Chapman and Hall, 1990:99-125.

[4] Airaksinen MS, Thoenen H, Meyer M. Vulnerability of midbrain dopaminergic neurons in calbindin-D28k- deficient mice: lack of evidence for a neuroprotective role of endogenous calbindin in MPTP-treated and weaver mice. *Eur.J.Neurosci.* 1997, 9:120-127.

[5] Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 1989, 12:366-375.

[6] Ali SF, David SN, Newport GD. Age-related susceptibility to MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology* 1993, 14:29-34.

[7] Altar CA, Heikkila RE, Manzino L, Marien MR. 1-Methyl-4-phenylpyridine (MPP+): regional dopamine neuron uptake, toxicity, and novel rotational behavior following dopamine receptor proliferation. *Eur.J.Pharmacol.* 1986, 131:199-209.

[8] Ambrosio S, Blesa R, Mintenig GM, Palacios AL, Mahy N, Gual A. Acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on catecholamines in heart, adrenal gland, retina and caudate nucleus of the cat. *Toxicol.Lett.* 1988, 44:1-6.

[9] Ambrosio S, Gerli P, Perego C, Algeri S. Different toxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the nigrostriatal and mesolimbic pathways. *Eur.J.Pharmacol.* 1987, 133:239-241.

[10] Andersen JK, Frim DM, Isacson O, Beal MF, Breakefield XO. Elevation of neuronal MAO-B activity in a transgenic mouse model does not increase sensitivity to the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Brain Res.* 1994, 656:108-114.

[11] Andrews AM, Murphy DL. Sustained depletion of cortical and hippocampal serotonin and norepinephrine but not striatal dopamine by 1-methyl-4-(2'-aminophenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine (2'-NH2-MPTP): a comparative study with 2'-CH3-MPTP and MPTP. *J.Neurochem.* 1993, 60:1167-1170.

[12] Antelman SM, Szechtman H. Tail pinch induces eating in sated rats which appears to depend on nigrostriatal dopamine. *Science* 1975, 189:731-733.

[13] Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A.* 1993, 90:11995-11999.

[14] Antonawich FJ, Melton CS, Wu P, Davis JN. Nesting and shredding behavior as an indicator of hippocampal ischemic damage. *Brain Res.* 1997, 764:249-252.

[15] Aoyama S, Kase H, Borrelli E. Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A2A receptor antagonist. *J Neurosci.* 2000, 20:5848-5852.

[16] Ara J, Przedborski S, Naini AB, Jackson L, V, Trifiletti RR, Horwitz J, Ischiropoulos H. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.* 1998, 95:7659-7663.

[17] Arai N, Misugi K, Goshima Y, Misu Y. Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mouse model for parkinsonism. *Brain Res.* 1990, 515:57-63.

[18] Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim.Behav.* 1973, 21:205-235.

[19] Arvin M, Fedorkova L, Disshon KA, Dluzen DE, Leipheimer RE. Estrogen modulates responses of striatal dopamine neurons to MPP+: evaluations using in vitro and in vivo techniques. *Brain Res.* 2000, 872:160-171.

[20] Austad SN. Issues in the choice of genetic configuration for animal aging models. *Exp.Gerontol.* 1997, 32:55-63.

[21] Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E. Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 1995, 377:424-428.

[22] Baker H, Joh TH, Reis DJ. Genetic control of number of midbrain dopaminergic neurons in inbred strains of mice: relationship to size and neuronal density of the striatum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1980, 77:4369-4373.

[23] Barbeau A, Dallaire L, Buu NT, Poirier J, Rucinska E. Comparative behavioral, biochemical and pigmentary effects of MPTP, MPP+ and paraquat in Rana pipiens. *Life Sci.* 1985, 37:1529-1538.

[24] Barkley MS, Lasley BL, Thompson MA, Shackleton CH. Equol: a contributor to enigmatic immunoassay measurements of estrogen. *Steroids* 1985, 46:587-608.

[25] Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D, Wynshaw-Boris A. Atm-Deficient Mice: A Paradigm of Ataxia Telangiectasia. *Cell* 1996, 86:159-171.

[26] Barnes NJ, Bradbury AJ, Costall B, Domeney AM, Kelly ME, Naylor RJ. Neuropharmacological manipulations with MPTP. *J.Neural Transm.Suppl.* 1986, 20:47-63.

[27] Beamer WG, Wilson MC, Leiter EH. Endocrinology. In: Foster HL, Small JD, Fox JG, eds. The mouse in biomedical research. Vol III: Normative Biology, Immunology, and Husbandry. New York: Academic Press, 1983:166-247.

[28] Becker JB. Direct effect of 17 beta-estradiol on striatum: sex differences in dopamine release. *Synapse* 1990, 5:157-164.

[29] Behmand RA, Harik SI. Nicotine enhances 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *J.Neurochem.* 1992, 58:776-779.

[30] Belknap JK, Riggan J, Cross S, Young ER, Gallaher EJ, Crabbe JC. Genetic determinants of morphine activity and thermal responses in 15 inbred mouse strains. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1998, 59:353-360.

[31] Belzung C, Le Pape G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiol.Behav.* 1994, 56:623-628.

[32] Bergman H, Feingold A, Nini A, Raz A, Slovin H, Abeles M, Vaadia E. Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci.* 1998, 21:32-38.

[33] Bernardini GL, Speciale SG, German DC. Increased midbrain dopaminergic cell activity following 2'CH3-MPTP-induced dopaminergic cell loss: an in vitro electrophysiological study. *Brain Res.* 1990, 527:123-129.

[34] Bezard E, Dovero S, Bioulac B, Gross C. Effects of different schedules of MPTP administration on dopaminergic neurodegeneration in mice. *Exp.Neurol.* 1997, 148:288-292.

[35] Bezard E, Gross CE. Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: Towards a dynamic approach. *Prog.Neurobiol.* 1998, 55:93-116.

[36] Bezard E, Gross CE, Fournier MC, Dovero S, Bloch B, Jaber M. Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp.Neurol.* 1999, 155:268-273.

[37] Bezard E, Jaber M, Gonon F, Boireau A, Bloch B, Gross CE. Adaptive changes in the nigrostriatal pathway in response to increased 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration in the mouse. *Eur.J.Neurosci.* 2000, 12:2892-2900.

[38] Björklund A, Lindvall O. Dopamine-containing systems in the CNS. In: Björklund A, Hökfelt T, eds. Classical transmitters in the CNS. Amsterdam: Elsevier, 1984:55-122.

[39] Blizard DA, Darvasi A. Experimental strategies for quantitative trait loci (QTL) analysis in laboratory animals. In: Crusio WE, Gerlai RT, eds. Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research. Amsterdam: Elsevier, 1999:82-99.

[40] Boatell ML, Mahy N, Cardozo A, Ambrosio S, Tolosa E, Cruz Sanchez FF. Neuronal changes in the nigrostriatal pathway of 1-methyl-4- phenylpyridine-treated mice. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* 1992, 14:781-787.

[41] Boireau A, Dubedat P, Bordier F, Peny C, Miquet JM, Durand G, Meunier M, Doble A. Riluzole and experimental parkinsonism: antagonism of MPTP-induced decrease in central dopamine levels in mice. *Neuroreport* 1994, 5:2657-2660.

[42] Bonuccelli U, Fariello RG. Evidence for an epileptogenic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine. *Neuropharmacology* 1989, 28:1419-1422.

[43] Bonuccelli U, Garant D, Fariello R. The acute convulsant effect of MPTP is dependent on intracerebral MPP+. *Neurosci.Lett.* 1991, 124:22-26.

[44] Bradbury AJ, Costall B, Domeney AM, Jenner P, Kelly ME, Marsden CD, Naylor RJ. 1-methyl-4-phenylpyridine is neurotoxic to the nigrostriatal dopamine pathway. *Nature* 1986, 319:56-57.

[45] Bradbury AJ, Costall B, Jenner PG, Kelly ME, Marsden CD, Naylor RJ. MPP+ can disrupt the nigrostriatal dopamine system by acting in the terminal area. *Neuropharmacology* 1986, 25:939-941.

[46] Bradbury AJ, Costall B, Jenner PG, Kelly ME, Marsden CD, Naylor RJ. The effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on striatal and limbic catecholamine neurones in white and black mice. Antagonism by monoamine oxidase inhibitors. *Neuropharmacology* 1986, 25:897-904.

[47] Brodkin ES, Nestler EJ. Quantitative Trait Locus Analysis: A New Tool for Psychiatric Genetics. *The Neuroscientist* 1998, 4:317-323.

[48] Broida J, Svare B. Mice: progesterone and the regulation of strain differences in pregnancy-induced nest building. *Behav.Neurosci.* 1983, 97:994-1004.

[49] Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory SD, Federoff HJ. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res.* 1999, 823:1-10.

[50] Brouillet E, Beal MF. NMDA antagonists partially protect against MPTP induced neurotoxicity in mice. *Neuroreport* 1993, 4:387-390.

[51] Bulloch K, Hamburger RN, Loy R. Nest-building behavior in two cerebellar mutant mice: staggerer and weaver. *Behav.Neural Biol.* 1982, 36:94-97.

[52] Burke RE. Apoptosis in Degenerative Diseases of the Basal Ganglia. *Prog.Clin.Neurosci.* 1998, 4:301-311.

[53] Burke RE. Programmed cell death and Parkinson's disease. *Mov.Disord.* 1998, 13 Suppl 1:17-23.

[54] Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1983, 80:4546-4550.

[55] Burton K, Calne DB. Aetiology of Parkinson's disease. In: Stern GM, ed. Parkinson's disease. London: Chapman and Hall, 1990:269-293.

[56] Cabib S, Algeri S, Perego C, Puglisi-Allegra S. Behavioral and biochemical changes monitored in two inbred strains of mice during exploration of an unfamiliar environment. *Physiol.Behav.* 1990, 47:749-753.

[57] Cadet JL, Brannock C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem.Int.* 1998, 32:117-131.

[58] Caldarone B, Saavedra C, Tartaglia K, Wehner JM, Dudek BC, Flaherty L. Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. *Nat.Genet.* 1997, 17:335-337.

[59] Camins A, Sureda FX, Gabriel C, Pallas M, Escubedo E, Camarasa J. Effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) on mitochondrial membrane potential in cerebellar neurons: interaction with the NMDA receptor. *J.Neural Transm.* 1997, 104:569-577.

[60] Campbell JM, Payne AP, Gilmore DP, Byrne JE, Russell D, McGadey J, Clarke DJ, Davies RW, Sutcliffe RG. Neostriatal dopamine depletion and locomotor abnormalities due to the Albino Swiss rat agu mutation. *Neurosci.Lett.* 1996, 213:173-176.

[61] Campbell JM, Payne AP, Gilmore DP, Russell D, McGadey J, Clarke DJ, Branton R, Davies RW, Sutcliffe RG. Age changes in dopamine levels in the corpus striatum of Albino Swiss (AS) and AS/AGU mutant rats. *Neurosci.Lett.* 1997, 239:54-56.

[62] Chadi G, Moller A, Rosen L, Janson AM, Agnati LA, Goldstein M, Ogren SO, Pettersson RF, Fuxe K. Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. *Exp.Brain Res.* 1993, 97:145-158.

[63] Chan P, Di Monte DA, Langston JW, Janson AM. (+)MK-801 does not prevent MPTP-induced loss of nigral neurons in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1997, 280:439-446.

[64] Chan P, Langston JW, Di Monte DA. MK-801 temporarily prevents MPTP-induced acute dopamine depletion and MPP+ elimination in the mouse striatum. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1993, 267:1515-1520.

[65] Chang FW, Wang SD, Lu KT, Lee EH. Differential interactive effects of gliotoxin and MPTP in the substantia nigra and the locus coeruleus in BALB/c mice. *Brain Res.Bull.* 1993, 31:253-266.

[66] Checkoway H, Farin FM, Costa MP, Kirchner SC, Costa LG. Genetic polymorphisms in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 1998, 19:635-643.

[67] Chesselet MF, Delfs JM. Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci.* 1996, 19:417-422.

[68] Chia LG, Liu SP, Lee EH. Differential effects of deprenyl and MPTP on catecholamines and activity in BALB/c mice. *Neuroreport* 1992, 3:777-780.

[69] Chia LG, Ni DR, Cheng FC, Ho YP, Kuo JS. Intrastriatal injection of 5,7-dihydroxytryptamine decreased 5-HT levels in the striatum and suppressed locomotor activity in C57BL/6 mice. *Neurochem.Res.* 1999, 24:719-722.

[70] Chia LG, Ni DR, Cheng LJ, Kuo JS, Cheng FC, Dryhurst G. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 5,7-dihydroxytryptamine on the locomotor activity and striatal amines in C57BL/6 mice. *Neurosci.Lett.* 1996, 218:67-71.

[71] Chiueh CC, Rauhala P. Free radicals and MPTP-induced selective destruction of substantia nigra compacta neurons. *Adv.Pharmacol.* 1998, 42:796-800.

[72] Christensen LB. Experimental methodology. Boston: Allyn and Bacon, 1977:95-122 (Kapitel 5: Control in Experimentation).

[73] Clarke DJ, Payne AP. Neuroanatomical characterization of a new mutant rat with dopamine depletion in the substantia nigra. *Eur.J.Neurosci.* 1994, 6:885-888.

[74] Clement Y, Martin B, Venault P, Chapouthier G. Involvement of regions of the 4th and 7th chromosomes in the open-field activity of mice. *Behav.Brain Res.* 1995, 70:51-57.

[75] Cochiolo JA, Ehsanian R, Bruck DK. Acute ultrastructural effects of MPTP on the nigrostriatal pathway of the C57BL/6 adult mouse: Evidence of compensatory plasticity in nigrostriatal neurons. *J.Neurosci.Res.* 2000, 59:126-135.

[76] Colotla VA, Flores E, Oscos A, Meneses A, Tapia R. Effects of MPTP on locomotor activity in mice. *Neurotoxicol.Teratol.* 1990, 12:405-407.

[77] Corsini GU, Pintus S, Chiueh CC, Weiss JF, Kopin IJ. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in mice is enhanced by pretreatment with diethyldithiocarbamate. *Eur.J.Pharmacol.* 1985, 119:127-128.

[78] Cosi C, Colpaert F, Koek W, Degryse A, Marien M. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors protect against MPTP- induced depletions of striatal dopamine and cortical noradrenaline in C57B1/6 mice. *Brain Res.* 1996, 729:264-269.

[79] Cosi C, Marien M. Decreases in mouse brain NAD(+) and ATP induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): prevention by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, benzamide. *Brain Res.* 1998, 809:58-67.

[80] Coté L, Crutcher MD. The basal ganglia. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. Principles of Neural Science. 3rd Ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1991:647-659.

[81] Crabbe JC. Provisional mapping of quantitative trait loci for chronic ethanol withdrawal severity in BXD recombinant inbred mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1998, 286:263-271.

[82] Crabbe JC, Phillips TJ, Buck KJ, Cunningham CL, Belknap JK. Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: recent progress and future directions. *Trends Neurosci.* 1999, 22:173-179.

[83] Crabbe JC, Phillips TJ, Gallaher EJ, Crawshaw LI, Mitchell SR. Common genetic determinants of the ataxic and hypothermic effects of ethanol in BXD/Ty recombinant inbred mice: genetic correlations and quantitative trait loci. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1996, 277:624-632.

[84] Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC. Genetics of mouse behavior: Interactions with laboratory environment. *Science* 1999, 284:1670-1672.

[85] Crawley JN. Unusual behavioral phenotypes of inbred mouse strains. *Trends Neurosci.* 1996, 19:181-182.

[86] Crawley JN. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res.* 1999, 835:18-26.

[87] Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw Boris A, Paylor R. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology Berl.* 1997, 132:107-124.

[88] D'Amato RJ, Alexander GM, Schwartzman RJ, Kitt CA, Price DL, Snyder SH. Evidence for neuromelanin involvement in MPTP-induced neurotoxicity. *Nature* 1987, 327:324-326.

[89] D'Amato RJ, Alexander GM, Schwartzman RJ, Kitt CA, Price DL, Snyder SH. Neuromelanin: a role in MPTP-induced neurotoxicity. *Life Sci.* 1987, 40:705-712.

[90] D'Amato RJ, Lipman ZP, Snyder SH. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin. *Science* 1986, 231:987-989.

[91] Dains K, Hitzemann B, Hitzemann R. Genetics, neuroleptic response and the organization of cholinergic neurons in the mouse striatum. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 1996, 279:1430-1438.

[92] Darvasi A. Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nat.Genet.* 1998, 18:19-24.

[93] Date I, Felten DL, Felten SY. Long-term effect of MPTP in the mouse brain in relation to aging: neurochemical and immunocytochemical analysis. *Brain Res.* 1990, 519:266-276.

[94] Davis CF, Davis BF, Halaris AE. Variations in the uptake of 3H-dopamine during the estrous cycle. *Life Sci.* 1977, 20:1319-1332.

[95] Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1979, 1:249-254.

[96] Davis KD, Taub E, Houle S, Lang AE, Dostrovsky JO, Tasker RR, Lozano AM. Globus pallidus stimulation activates the cortical motor system during alleviation of parkinsonian symptoms. *Nat.Med.* 1997, 3:671-674.

[97] De Michele G, Filla A, Volpe G, De Marco V, Gogliettino A, Ambrosio G, Marconi R, Castellano AE, Campanella G. Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in southern Italy. *Mov.Disord.* 1996, 11:17-23.

[98] Disshon KA, Dluzen DE. Estrogen as a neuromodulator of MPTP-induced neurotoxicity: effects upon striatal dopamine release. *Brain Res.* 1997, 764:9-16.

[99] Dluzen D. Estrogen decreases corpus striatal neurotoxicity in response to 6-hydroxydopamine. *Brain Res.* 1997, 767:340-344.

[100] Dluzen D, Jain R, Liu B. Modulatory effects of testosterone on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J.Neurochem.* 1994, 62:94-101.

[101] Dluzen DE. Effects of testosterone upon MPTP-induced neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system of C57/Bl mice. *Brain Res.* 1996, 715:113-118.

[102] Dluzen DE, Kreutzberg JD. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) disrupts social memory/recognition processes in the male mouse. *Brain Res.* 1993, 609:98-102.

[103] Dluzen DE, McDermott JL, Liu B. Estrogen alters MPTP-induced neurotoxicity in female mice: effects on striatal dopamine concentrations and release. *J.Neurochem.* 1996, 66:658-666.

[104] Dluzen DE, McDermott JL, Liu B. Estrogen as a neuroprotectant against MPTP-induced neurotoxicity in C57/Bl mice. *Neurotoxicol.Teratol.* 1996, 18:603-606.

[105] Donnan GA, Willis GL, Kaczmarczyk SJ, Rowe P. Motor function in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mouse. *J.Neurol.Sci.* 1987, 77:185-191.

[106] Donovan DM, Miner LL, Perry MP, Revay RS, Sharpe LG, Przedborski S, Kostic V, Philpot RM, Kirstein CL, Rothman RB, Schindler CW, Uhl GR. Cocaine reward and MPTP toxicity: alteration by regional variant dopamine transporter overexpression. *Mol.Brain Res.* 1999, 73:37-49.

[107] Doudet DJ, Chan GLY, Holden JE, McGeer EG, Aigner TA, Wyatt RJ, Ruth TJ. 6-[F-18]fluoro-L-DOPA PET studies of the turnover of dopamine in MPTP-induced parkinsonism in monkeys. *Synapse* 1998, 29:225-232.

[108] Duan W, Mattson MP. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J.Neurosci.Res.* 1999, 57:195-206.

[109] Dubnau J, Tully T. Gene discovery in Drosophila: new insights for learning and memory. *Annu.Rev.Neurosci.* 1998, 21:407-444.

[110] Duvoisin RC. Role of genetics in the cause of Parkinson's disease. *Mov.Disord.* 1998, 13 Suppl 1:7-12.

[111] Duvoisin RC, Heikkila RE, Nicklas WJ, Hess A. Dopaminergic neurotoxicity of MPTP in the mouse: a murine model of parkinsonism. In: Fahn S, Marsden CD, Jenner P, Teychenne P, eds. Recent developments in Parkinson's disease. New York: Raven Press, 1986:147-154.

[112] El-Agnaf OMA, Jakes R, Curran MD, Wallace A. Effects of the mutations Ala(30) to Pro and Ala(53) to Thr on the physical and morphological properties of alpha-synuclein protein implicated in Parkinson's disease. *FEBS Letters* 1998, 440:67-70.

[113] Fallon JH, Moore RY. Catecholamine innervation of the basal forebrain. III. Olfactory bulb, anterior olfactory nuclei, olfactory tubercle and piriform cortex. *J.Comp.Neurol.* 1978, 180:533-544.

[114] Fallon JH, Moore RY. Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J.Comp.Neurol.* 1978, 180:545-580.

[115] Fazzini E, Durso R, Davoudi H, Szabo GK, Albert ML. GM1 gangliosides alter acute MPTP-induced behavioral and neurochemical toxicity in mice. *J.Neurol.Sci.* 1990, 99:59-68.

[116] Feldman RG, Ratner MH. The pathogenesis of neurodegenerative disease: neurotoxic mechanisms of action and genetics. *Curr.Opin.Neurol.* 1999, 12:725-731.

[117] Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. Principles of Neuropsychopharmacology. Sunderland: Sinauer Associates, 1997.

[118] Ferger B, Spratt C, Earl CD, Teismann P, Oertel WH, Kuschinsky K. Effects of nicotine on hydroxyl free radical formation in vitro and on MPTP-induced neurotoxicity in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 1998, 358:351-359.

[119] Ferger B, Spratt C, Teismann P, Seitz G, Kuschinsky K. Effects of cytisine on hydroxyl radicals in vitro and MPTP-induced dopamine depletion in vivo. *Eur.J.Pharmacol.* 1998, 360:155-163.

[120] Ferger B, Teismann P, Earl CD, Kuschinsky K, Oertel WH. Salicylate protects against MPTP-induced impairments in dopaminergic neurotransmission at the striatal and nigral level in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 1999, 360:256-261.

[121] Ferger B, Teismann P, Earl CD, Kuschinsky K, Oertel WH. The protective effects of PBN against MPTP toxicity are independent of hydroxyl radical trapping. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 2000, 65:425-431.

[122] Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, Schork NJ, St.-Jean P, Ballas C, Choi H, Berrettini WH. Mapping murine loci for seizure response to kainic acid. *Mamm.Genome* 1997, 8:200-208.

[123] Festing MF. Phenotypic variability of inbred and outbred mice. *Nature* 1976, 263:230-232.

[124] Festing MF. Genetic factors in neurotoxicology and neuropharmacology: a critical evaluation of the use of genetics as a research tool. *Experientia* 1991, 47:990-998.

[125] Festing MFW. Nomenclature of genetically defined mouse strains. In: Goldowitz D, Wahlsten D, Wimer RE, eds. Techniques for the genetic analysis of brain and behavior. Amsterdam: Elsevier, 1992:135-138.

[126] Fleming L, Mann JB, Bean J, Briggle T, Sanchez RJ. Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides. *Ann.Neurol.* 1994, 36:100-103.

[127] Flint J, Corley R. Do animal models have a place in the genetic analysis of quantitative human behavioural traits? *J.Mol.Med.* 1996, 74:515-521.

[128] Flint J, Corley R, DeFries JC, Fulker DW, Gray JA, Miller S, Collins AC. A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science* 1995, 269:1432-1435.

[129] Fornaguera Trías, J. Unilaterale 6-OHDA Läsion des nigrostriatalen Systems: Beziehung zwischen Neurochemie und Verhalten. Dissertation, Universität Düsseldorf, 1994.

[130] Fornai F, Alessandri MG, Fascetti F, Vaglini F, Corsini GU. Clonidine suppresses 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced reductions of striatal dopamine and tyrosine hydroxylase activity in mice. *J.Neurochem.* 1995, 65:704-709.

[131] Fornai F, Vaglini F, Maggio R, Bonuccelli U, Corsini GU. Species differences in the role of excitatory amino acids in experimental parkinsonism. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 1997, 21:401-415.

[132] Forno LS. Pathology of Parkinson's disease: the importance of the substantia nigra and Lewy bodies. In: Stern GM, ed. Parkinson's disease. London: Chapman and Hall, 1990:185-238.

[133] Forno LS, Delanney LE, Irwin I, Langston JW. Ultrastructure of eosinophilic inclusion bodies in the amygdala-parahippocampal region of aged squirrel monkeys treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, a dopaminergic neurotoxin. *Neurosci.Lett.* 1995, 184:44-47.

[134] Frankel WN, Taylor BA. Mapping single locus mutations in mice: towards gene identification of neurological traits. In: Crusio WE, Gerlai RT, eds. Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research. Amsterdam: Elsevier, 1999:61-81.

[135] Franklin, K. B. J. and Paxinos, G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 1997. Academic Press. San Diego.

[136] Fredriksson A, Archer T. MPTP-induced behavioural and biochemical deficits: a parametric analysis. *J.Neural Transm.Park.Dis.Dement.Sect.* 1994, 7:123-132.

[137] Fredriksson A, Archer T. Synergistic interactions between COMT-/MAO-inhibitors and L-Dopa in MPTP-treated mice. *J.Neural Transm.Gen.Sect.* 1995, 102:19-34.

[138] Fredriksson A, Eriksson P, Archer T. MPTP-induced deficits in motor activity: neuroprotective effects of the spintrapping agent, alpha-phenyl-tert-butyl-nitrone (PBN). *J.Neural Transm.* 1997, 104:579-592.

[139] Fredriksson A, Fredriksson M, Eriksson P. Neonatal exposure to paraquat or MPTP induces permanent changes in striatum dopamine and behavior in adult mice. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 1993, 122:258-264.

[140] Fredriksson A, Gentsch C, Archer T. Effect of the competitive NMDA antagonist, CGP 40 116, and a low dose of L-Dopa on the motor activity deficit of MPTP-treated mice. *Behavioural Pharmacol.* 1994, 5:599-606.

[141] Fredriksson A, Gentsch C, Archer T. Synergistic interactions between NMDA-antagonists and L-dopa on activity in MPTP-treated mice. *J.Neural Transm.Gen.Sect.* 1994, 97:197-209.

[142] Fredriksson A, Palomo T, Archer T. Effects of co-administration of anticonvulsant and putative anticonvulsive agents and sub/suprathreshold doses of L-dopa upon motor behaviour of MPTP-treated mice. *J.Neural Transm.* 1999, 106:889-909.

[143] Fredriksson A, Palomo T, Chase T, Archer T. Tolerance to a suprathreshold dose of L-Dopa in MPTP mice: effects of glutamate antagonists. *J.Neural Transm.* 1999, 106:283-300.

[144] Fredriksson A, Plaznik A, Sundström E, Archer T. Effects of D1 and D2 agonists on spontaneous motor activity in MPTP treated mice. *Pharmacol.Toxicol.* 1994, 75:36-41.

[145] Fredriksson A, Plaznik A, Sundström E, Jonsson G, Archer T. MPTP-induced hypoactivity in mice: reversal by L-dopa. *Pharmacol.Toxicol.* 1990, 67:295-301.

[146] Freyaldenhoven TE, Ali SF. Role of heat shock proteins in MPTP-induced neurotoxicity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1997, 825:167-178.

[147] Freyaldenhoven TE, Ali SF, Hart RW. MPTP- and MPP(+)-induced effects on body temperature exhibit age- and strain-dependence in mice. *Brain Res.* 1995, 688:161-170.

[148] Freyaldenhoven TE, Cadet JL, Ali SF. The dopamine-depleting effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in CD-1 mice are gender-dependent. *Brain Res.* 1996, 735:232-238.

[149] Frisch C, Dere E, De Souza Silva MA, Huston JP, Schrader J. Superior water maze learning and increase in fear-related behavior in the eNOS-/- mouse together with monoamine changes in cerebellum and ventral striatum. *J Neurosci.* 2000, 20:6694-6700.

[150] Frohna PA, Rothblat DS, Joyce JN, Schneider JS. Alterations in dopamine uptake sites and D1 and D2 receptors in cats symptomatic for and recovered from experimental parkinsonism. *Synapse* 1995, 19:46-55.

[151] Fuller RW, Hahn RA, Snoddy HD, Wikel JH. Depletion of cardiac norepinephrine in rats and mice by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Biochem.Pharmacol.* 1984, 33:2957-2960.

[152] Fuller RW, Hemrick-Luecke SK. Tissue concentrations of MPTP and MPP+ after administration of lethal and sublethal doses of MPTP to mice. *Toxicol.Lett.* 1990, 54:253-262.

[153] Fuller RW, Steranka LR. Central and peripheral catecholamine depletion by 1-methyl-4-phenyl-tetrahydropyridine (MPTP) in rodents. *Life Sci.* 1985, 36:243-247.

[154] Fung YK, Troxel CE. Amphetamine-induced circling behaviour in MPTP-lesioned mice. *J.Pharm.Pharmacol.* 1985, 37:922-923.

[155] Furness JB, Llewellyn-Smith IJ, Bornstein JC, Costa M. Chemical neuroanatomy and the analysis of neuronal circuitry in the enteric nervous system. In: Björklund A, Hökfelt T, Owman C, eds. The peripheral nervous system. Amsterdam: Elsevier, 1988:161-218.

[156] Gainetdinov RR, Fumagalli F, Jones SR, Caron MG. Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J.Neurochem.* 1997, 69:1322-1325.

[157] Gainetdinov RR, Fumagalli F, Wang YM, Jones SR, Levey AI, Miller GW, Caron MG. Increased MPTP neurotoxicity in vesicular monoamine transporter 2 heterozygote knockout mice. *J.Neurochem.* 1998, 70:1973-1978.

[158] Gallaher EJ, Jones GE, Belknap JK, Crabbe JC. Identification of genetic markers for initial sensitivity and rapid tolerance to ethanol-induced ataxia using quantitative trait locus analysis in BXD recombinant inbred mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1996, 277:604-612.

[159] Gangrade BK, Dominic CJ. Oestrus induction in unisexually grouped mice by multiple short-term exposures to males. *Experientia* 1983, 39:431-432.

[160] Gasser T, Muller Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznai B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat.Genet.* 1998, 18:262-265.

[161] Georgiev V, Kambourova T. Behavioural effects of angiotensin II in the mouse following MPTP administration. *Gen.Pharmacol.* 1991, 22:625-630.

[162] Gerlach M, Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J.Neural Transm.* 1996, 103:987-1041.

[163] Gerlai R. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci.* 1996, 19:177-181.

[164] Gerlai R, Clayton NS. Analysing hippocampal function in transgenic mice: an ethological perspective. *Trends.Neurosci.* 1999, 22:47-51.

[165] Gerlai R, Thibodeaux H, Palmer JT, Campagne MV, Van Bruggen N. Transient focal cerebral ischemia induces sensorimotor deficits in mice. *Behav.Brain Res.* 2000, 108:63-71.

[166] German DC, Nelson EL, Liang CL, Speciale SG, Sinton CM, Sonsalla PK. The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. *Neurodegeneration* 1996, 5:299-312.

[167] Giovanni A, Sieber BA, Heikkila RE, Sonsalla PK. Correlation between the neostriatal content of the 1-methyl-4-phenylpyridinium species and dopaminergic neurotoxicity following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration to several strains of mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1991, 257:691-697.

[168] Giovanni A, Sieber BA, Heikkila RE, Sonsalla PK. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: Systemic administration. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1994, 270:1000-1007.

[169] Giovanni A, Sonsalla PK, Heikkila RE. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1994, 270:1008-1014.

[170] Golbe LI. The genetics of Parkinson's disease. *Rev.Neurosci.* 1993, 4:1-16.

[171] Golbe LI. Alpha-Synuclein and Parkinson's Disease. *Mov.Disord.* 1999, 14:6-9.

[172] Goodwin BL, Kite GC. Environmental MPTP as a factor in the aetiology of Parkinson's disease? *J.Neural Transm.* 1998, 105:1265-1269.

[173] Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 1998, 50:1346-1350.

[174] Grandbois M, Morissette M, Callier S, Di-Paolo T. Ovarian steroids and raloxifene prevent MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Neuroreport* 2000, 11:343-346.

[175] Graybiel AM. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends.Neurosci* 1990, 13:244-254.

[176] Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology* 2000, 148:164-170.

[177] Grimsby J, Toth M, Chen K, Kumazawa T, Klaidman L, Adams JD, Karoum F, Gal J, Shih JC. Increased stress response and beta-phenylethylamine in MAOB-deficient mice. *Nat.Genet.* 1997, 17:206-210.

[178] Grisel JE, Belknap JK, OToole LA, Helms ML, Wenger CD, Crabbe JC. Quantitative trait loci affecting methamphetamine responses in BXD recombinant inbred mouse strains. *J.Neurosci.* 1997, 17:745-754.

[179] Gruber SA, Hoffman RA, Sothern RB, Lakatua D, Carlson A, Simmons RL, Hrushesky WJ. Splenocyte natural killer cell activity and metastatic potential are inversely dependent on estrous stage. *Surgery* 1988, 104:398-403.

[180] Gupta M, Gupta BK, Thomas R, Bruemmer V, Sladek JR Jr., Felten DL. Aged mice are more sensitive to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment than young adults. *Neurosci.Lett.* 1986, 70:326-331.

[181] Hadjiconstantinou M, Weihmuller F, Neff NH. Treatment with GM1 ganglioside reverses dopamine D-2 receptor supersensitivity induced by the neurotoxin MPTP. *Eur.J.Pharmacol.* 1989, 168:261-264.

[182] Hadley ME. Endocrinology. 2nd Ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1988: 428-451 (Kapitel 18: Hormones and Female Reproductive Physiology).

[183] Hallman H, Olson L, Jonsson G. Neurotoxicity of the meperidine analogue N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *Eur.J.Pharmacol.* 1984, 97:133-136.

[184] Hamre K, Tharp R, Poon K, Xiong XP, Smeyne RJ. Differential strain susceptibility following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration acts in an autosomal dominant fashion: quantitative analysis in seven strains of Mus musculus. *Brain Res.* 1999, 828:91-103.

[185] Hassouna I, Wickert H, Zimmermann M, Gillardon F. Increase in bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment of mice. *Neurosci.Lett.* 1996, 204:85-88.

[186] Hauber W. Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Prog.Neurobiol.* 1998, 56:507-540.

[187] Heikkila RE. Differential neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) in Swiss-Webster mice from different sources. *Eur.J.Pharmacol.* 1985, 117:131-133.

[188] Heikkila RE, Cabbat FS, Manzino L, Duvoisin RC. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine on neostriatal dopamine in mice. *Neuropharmacology* 1984, 23:711-713.

[189] Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 1984, 224:1451-1453.

[190] Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: relationships between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. *Life Sci.* 1985, 36:231-236.

[191] Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS, Duvoisin RC. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* 1984, 311:467-469.

[192] Heikkila RE, Sonsalla PK. The MPTP-treated mouse as a model of parkinsonism: how good is it? *Neurochem.Int.* 1992, 20 Suppl:299S-303S.

[193] Herreo MT, Augood SJ, Aseni H, Hirsch EC, Agid Y, Obeso JA, Emson PC. Effects of L-DOPA-therapy on dopamine D2 receptor MRNA expression in the striatum of MPTP-intoxicated parkinsonian monkeys. *Mol.Brain Res.* 1996, 42:149-155.

[194] Hirsch EC, Faucheux BA. Iron metabolism and Parkinson's disease. *Mov.Disord.* 1998, 13 Suppl 1:39-45.

[195] Hirsch J. Behavior-genetic analysis. In: Hirsch J, ed. Behavior-genetic analysis. New York: McGraw-Hill, 1967:416-435.

[196] Ho A, Blum M. Induction of interleukin-1 associated with compensatory dopaminergic sprouting in the denervated striatum of young mice: model of aging and neurodegenerative disease. *J.Neurosci.* 1998, 18:5614-5629.

[197] Hochman A, Sternin H, Gorodin S, Korsmeyer S, Ziv I, Melamed E, Offen D. Enhanced oxidative stress and altered antioxidants in brains of Bcl-2-deficient mice. *J.Neurochem.* 1998, 71:741-748.

[198] Hofele K. Paroxysmale Dyskinesien und Morbus Parkinson: Molekulargenetische Untersuchungen zur Funktion der Basalganglien. Dissertation, Universität Düsseldorf, 1999.

[199] Hofele K, Sedelis M, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RKW. Evidence for a dissociation between MPTP-toxicity and tyrosinase activity based on congenic mouse strain susceptibility. *Experimental Neurology*, im Druck.

[200] Hoskins JA, Davis LJ. The acute effect on levels of catecholamines and metabolites in brain, of a single dose of MPTP in 8 strains of mice. *Neuropharmacology* 1989, 28:1389-1397.

[201] Hotz H, Semlitsch RD, Gutmann E, Guex GD, Beerli P. Spontaneous heterosis in larval life-history traits of hemiclonal frog hybrids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1999, 96:2171-2176.

[202] Hu SC, Chang FW, Sung YJ, Hsu WM, Lee EH. Neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the substantia nigra and the locus coeruleus in BALB/c mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1991, 259:1379-1387.

[203] Hung HC, Lee EH. The mesolimbic dopaminergic pathway is more resistant than the nigrostriatal dopaminergic pathway to MPTP and MPP+ toxicity: role of BDNF gene expression. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1996, 41:14-26.

[204] Hung HC, Lee EH. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radic.Biol.Med.* 1998, 24:76-84.

[205] Huston JP, Nef B, Papadopoulos G, Welzl H. Activation and lateralization of sensorimotor field for perioral biting reflex by intranigral GABA agonist and by systemic apomorphine in the rat. *Brain Res.Bull.* 1980, 5:745-749.

[206] Irwin I, Finnegan KT, Delanney LE, Di Monte D, Langston JW. The relationships between aging, monoamine oxidase, striatal dopamine and the effects of MPTP in C57BL/6 mice: a critical reassessment. *Brain Res.* 1992, 572:224-231.

[207] Irwin I, Langston JW. Safety and handling of MPTP. *Neurology* 1985, 35:619-619.

[208] Itzhak Y, Martin JL, Ali SF. Methamphetamine- and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurotoxicity in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Synapse* 1999, 34:305-312.

[209] Itzhak Y, Martin JL, Black MD, Ali SF. Effect of the dopaminergic neurotoxin MPTP on cocaine-induced locomotor sensitization. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1999, 63:101-107.

[210] Jaber M, Dumartin B, Sagne C, Haycock JW, Roubert C, Giros B, Bloch B, Caron MG. Differential regulation of tyrosine hydroxylase in the basal ganglia of mice lacking the dopamine transporter. *Eur.J.Neurosci.* 1999, 11:3499-3511.

[211] Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 1995, 4:257-269.

[212] Jarvis MF, Wagner GC. Neurochemical and functional consequences following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and methamphetamine. *Life Sci.* 1985, 36:249-254.

[213] Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov.Disord.* 1998, 13 Suppl 1:24-34.

[214] Joffe GT, Parks JK, Parker-WD J. Secondary inhibition of 2-ketoglutarate dehydrogenase complex by MPTP. *Neuroreport* 1998, 9:2781-2783.

[215] Johannessen JN, Adams JD, Schuller HM, Bacon JP, Markey SP. 1-Methyl-4-phenylpyridine (MPP+) induces oxidative stress in the rodent. *Life Sci.* 1986, 38:743-749.

[216] Jossan SS, Sakurai E, Oreland L. MPTP toxicity in relation to age, dopamine uptake and MAO-B activity in two rodent species. *Pharmacol.Toxicol.* 1989, 64:314-318.

[217] Jueptner M, Weiller C. A review of differences between basal ganglia and cerebellar control of movements as revealed by functional imaging studies. *Brain* 1998, 121:1437-1449.

[218] Kalra SP, Kalra PS. Temporal interrelationships among circulating levels of estradiol, progesterone and LH during the rat estrous cycle: effects of exogenous progesterone. *Endocrinology* 1974, 95:1711-1718.

[219] Kanthasamy AG, Kanthasamy A, Matsumoto RR, Vu TQ, Truong DD. Neuroprotective effects of the strychnine-insensitive glycine site NMDA antagonist (R)-HA-966 in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1997, 759:1-8.

[220] Kastner A, Hirsch EC, Lejeune O, Javoy AF, Rascol O, Agid Y. Is the vulnerability of neurons in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease related to their neuromelanin content? *J.Neurochem.* 1992, 59:1080-1089.

[221] Kawai H, Makino Y, Hirobe M, Ohta S. Novel endogenous 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives: uptake by dopamine transporter and activity to induce parkinsonism. *J.Neurochem.* 1998, 70:745-751.

[222] Kelly AE. Locomotor activity and exploration. In: Sahgal A, ed. Behavioural Neuroscience: A practical approach Vol. 2. Oxford: Oxford University Press, 1993:1-21.

[223] Kelly MA, Rubinstein M, Phillips TJ, Lessov CN, Burkhart KS, Zhang G, Bunzow JR, Fang Y, Gerhardt GA, Grandy DK, Low MJ. Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. *J.Neurosci.* 1998, 18:3470-3479.

[224] Kilbourn M, Frey K. Striatal concentrations of vesicular monoamine transporters are identical in MPTP-sensitive (C57BL/6) and -insensitive (CD-1) mouse strains. *Eur.J.Pharmacol.* 1996, 307:227-232.

[225] Kilbourn MR, Sherman P, Abbott LC. Reduced MPTP neurotoxicity in striatum of the mutant mouse Tottering. *Synapse* 1998, 30:205-210.

[226] Kita T, Paku S, Takahashi M, Kubo K, Wagner GC, Nakashima T. Methamphetamine-induced neurotoxicity in BALB/c, DBA/2N and C57BL/6N mice. *Neuropharmacology* 1998, 37:1177-1184.

[227] Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998, 392:605-608.

[228] Kitamura Y, Itano Y, Kubo T, Nomura Y. Suppressive effect of FK-506, a novel immunosuppressant, against MPTP-induced dopamine depletion in the striatum of young C57BL/6 mice. *J.Neuroimmunol.* 1994, 50:221-224.

[229] Klivenyi P, Andreassen O, Ferrante RJ, Lancelot E, Reif D, Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity. *Neuroreport* 2000, 11:1265-1268.

[230] Klivenyi P, Andreassen OA, Ferrante RJ, Dedeoglu A, Mueller G, Lancelot E, Bogdanov M, Andersen JK, Jiang D, Beal MF. Mice Deficient in Cellular Glutathione Peroxidase Show Increased Vulnerability to Malonate, 3-Nitropropionic Acid, and 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6-Tetrahydropyridine. *J.Neurosci.* 2000, 20:1-7.

[231] Kobayashi T, Araki T, Itoyama Y, Takeshita M, Ohta T, Oshima Y. Effects of L-dopa and bromocriptine on haloperidol-induced motor deficits in mice. *Life Sci.* 1997, 61:2529-2538.

[232] Kordower JH, Felten SY, Gash DM. Behavioral sequelae following MPTP administration in mice. In: Markey SP, Castagnoli N Jr., Trevor AJ, Kopin IJ, eds. MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. Orlando: Academic Press, 1986:413-417.

[233] Kotake Y, Tasaki Y, Makino Y, Ohta S, Hirobe M. 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline as a parkinsonism-inducing agent: a novel endogenous amine in mouse brain and parkinsonian CSF. *J.Neurochem.* 1995, 65:2633-2638.

[234] Köhler D. Grundprinzipien der Versuchstierzucht. In: Heinecke H, ed. Angewandte Versuchstierkunde. Stuttgart: Gustav Fischer, 1989:26-65.

[235] Krauth J. Nonparametric analysis of resonse curves. *J.Neurosci.Methods* 1980, 2:239-252.

[236] Krauth J. Distribution-free statistics. Amsterdam: Elsevier, 1988.

[237] Krauth J. Experimental design and data analysis in behavioral pharmacology. In: van Haaren F, ed. Methods in behavioral pharmacology. Amsterdam: Elsevier, 1993:623-650.

[238] Kruger R, Muller T, Riess O. Involvement of alpha-synuclein in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *J.Neural Transm.* 2000, 107:31-40.

[239] Kuhn W, Müller T, Nastos I, Poehlau D. The neuroimmune hypothesis in Parkinson's disease. *Rev.Neurosci.* 1997, 8:29-34.

[240] Kupsch A, Gerlach M, Pupeter SC, Sautter J, Dirr A, Arnold G, Opitz W, Przuntek H, Riederer P, Oertel WH. Pretreatment with nimodipine prevents MPTP-induced neurotoxicity at the nigral, but not at the striatal level in mice. *Neuroreport* 1995, 6:621-625.

[241] Kurkowska J, I, Wronska A, Kohutnicka M, Czlonkowski A, Czlonkowska A. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp.Neurol.* 1999, 156:50-61.

[242] Kurth JH, Kurth MC, Poduslo SE, Schwankhaus JD. Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 1993, 33:368-372.

[243] Lamberty Y, Gower AJ. Arm width and brightness modulation of spontaneous behaviour of two strains of mice tested in the elevated plus-maze. *Physiol.Behav.* 1996, 59:439-444.

[244] Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1987, 1:174-181.

[245] Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994, 265:2037-2048.

[246] Langston JW. The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology* 1996, 47:S153-60.

[247] Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983, 219:979-980.

[248] Langston JW, Ballard PAJ. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N.Engl.J.Med.* 1983, 309:310.

[249] Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwin I. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyrine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res.* 1984, 292:390-394.

[250] Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann.Neurol.* 1999, 46:598-605.

[251] Langston JW, Irwin I, Langston EB, DeLaynnay LE, Ricaurte GA. MPTP-induced parkinsonism in humans: A review of the syndrome and observations relating to the phenomenon of tardive toxicity. In: Markey SP, Castagnoli N Jr., Trevor AJ, Kopin IJ, eds. MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. Orlando: Academic Press, 1986:9-21.

[252] Lau YS, Fung YK. Pharmacological effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on striatal dopamine receptor system. *Brain Res.* 1986, 369:311-315.

[253] Le Fur N, Kelsall SR, Mintz B. Base substitution at different alternative splice donor sites of the tyrosinase gene in murine albinism. *Genomics* 1996, 37:245-248.

[254] Le Moal M, Simon H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: Functional and regulatory roles. *Physiol.Rev.* 1991, 71:155-234.

[255] Le Roy I. Quantitative Trait Loci (QTL) Mapping. In: Jones BC, Mormede P, eds. Neurobehavioral Genetics: Methods and applications. Boca Raton: CRC Press, 1999:69-76.

[256] Le Roy I, Perez DF, Cherfouh A, Roubertoux PL. Preweanling sensorial and motor development in laboratory mice: quantitative trait loci mapping. *Dev.Psychobiol.* 1999, 34:139-158.

[257] Lee EH, Lu KT. Neurotoxicity of MPTP and uptake of MPPT into dopamine and norepinephrine neurons in mice. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1995, 363:29-46.

[258] Leonard S, Luthman D, Logel J, Luthman J, Antle C, Freedman R, Hoffer B. Acidic and basic fibroblast growth factor mRNAs are increased in striatum following MPTP-induced dopamine neurofiber lesion: assay by quantitative PCR. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1993, 18:275-284.

[259] Leroux-Nicollet I, Costentin J. Acute locomotor effects of MPTP in mice and relationships with dopaminergic systems. In: Markey SP, Castagnoli N Jr., Trevor AJ, Kopin IJ, eds. MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. Orlando: Academic Press, 1986:419-424.

[260] Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998, 395:451-452.

[261] Liang CL, Sinton CM, Sonsalla PK, German DC. Midbrain dopaminergic neurons in the mouse that contain calbindin-D28k exhibit reduced vulnerability to MPTP-induced neurodegeneration. *Neurodegeneration* 1996, 5:313-318.

[262] Liberatore GT, Jackson L, V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat.Med.* 1999, 5:1403-1409.

[263] Linder JC, Klemfuss H, Groves PM. Acute ultrastructural and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mice. *Neurosci.Lett.* 1987, 82:221-226.

[264] Lipman RD. Pathobiology of aging rodents: inbred and hybrid models. *Exp.Gerontol.* 1997, 32:215-228.

[265] Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology Berl.* 1987, 92:180-185.

[266] Liu Y, Roghani A, Edwards RH. Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992, 89:9074-9078.

[267] Logroscino G, Marder K, Graziano J, Freyer G, Slavkovich V, Lojacono N, Cote L, Mayeux R. Dietary iron, animal fats, and risk of Parkinson's disease. *Mov.Disord.* 1998, 13 Suppl 1:13-16.

[268] Logue SF, Owen EH, Rasmussen DL, Wehner JM. Assessment of locomotor activity, acoustic and tactile startle, and prepulse inhibition of startle in inbred mouse strains and F-1 hybrids: Implications of genetic background for single gene and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 1997, 80:1075-1086.

[269] Loscher W, Fiedler M. The role of technical, biological, and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. VII. Seasonal influences on anticonvulsant drug actions in mouse models of generalized seizures. *Epilepsy Res.* 2000, 38:231-248.

[270] Luthman J, Sundström E. No apparent difference in the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the sympathetic system in NMRI and C57 BL/6 mice. *Toxicol.Lett.* 1990, 54:83-92.

[271] Lyden A, Bondesson U, Larsson BS, Lindquist NG, Olsson LI. Autoradiography of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): uptake in the monoaminergic pathways and in melanin containing tissues. *Acta Pharmacol.Toxicol.Copenh.* 1985, 57:130-135.

[272] Mandir AS, Przedborski S, Jackson L, V, Wang ZQ, Simbulan RC, Smulson ME, Hoffman BE, Guastella DB, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ABP-ribose) polymerase activation mediates 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1999, 96:5774-5779.

[273] Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 1984, 311:464-467.

[274] Marks MJ, Burch JB, Collins AC. Genetics of nicotine response in four inbred strains of mice. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 1983, 226:291-302.

[275] Marquette BW, Schneider CW. A longitudinal investigation of the effects of experience on the behavior of aging mice. *Growth Dev.Aging* 1991, 55:35-42.

[276] Marsden CD. Neurophysiology. In: Stern GM, ed. Parkinson's disease. London: Chapman and Hall, 1990:57-98.

[277] Marshall JF, Navarrete RJ. Contrasting tissue factors predict heterogeneous striatal dopamine neurotoxicity after MPTP or methamphetamine treatment. *Brain Res.* 1990, 534:348-351.

[278] Maruyama W, Abe T, Tohgi H, Naoi M. An endogenous MPTP-like dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in the cerebrospinal fluid decreases with progression of Parkinson's disease. *Neurosci.Lett.* 1999, 262:13-16.

[279] Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: Implications for neurodegenerative disorders. *Science* 2000, 287:1265-1269.

[280] Matsubara K, Gonda T, Sawada H, Uezono T, Kobayashi Y, Kawamura T, Ohtaki K, Kimura K, Akaike A. Endogenously occurring beta-carboline induces parkinsonism in nonprimate animals: a possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's disease. *J.Neurochem.* 1998, 70:727-735.

[281] Matsuura K, Kabuto H, Makino H, Ogawa N. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *J.Neurosci.Methods* 1997, 73:45-48.

[282] Matthews RT, Beal MF, Fallon J, Fedorchak K, Huang PL, Fishman MC, Hyman BT. MPP+ induced substantia nigra degeneration is attenuated in nNOS knockout mice. *Neurobiol.Dis.* 1997, 4:114-121.

[283] Mayer RA, Walters AS, Heikkila RE. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration to C57-black mice leads to parallel decrements in neostriatal dopamine content and tyrosine hydroxylase activity. *Eur.J.Pharmacol.* 1986, 120:375-377.

[284] McKeigue PM, Marmot MG. Epidemiology of Parkinson's disease. In: Stern GM, ed. Parkinson's disease. London: Chapman and Hall, 1990:295-306.

[285] McNaught KS, Carrupt PA, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Testa B, Jenner P, Marsden CD. Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacol.* 1998, 56:921-933.

[286] Mead LA, Hargreaves EL, Galea LAM. Sex differences in rodent spontaneous activity levels. In: Sanberg PR, Ossenkopp KP, Kavaliers M, eds. Motor Activity and Movement Disorders. Totowa NJ: Humana Press, 1996:111-139.

[287] Melega WP, Raleigh MJ, Stout DB, DeSalles AA, Cherry SR, Blurton Jones M, Morton GG, Huang SC, Phelps ME. Longitudinal behavioral and 6-[18F]fluoro-L-DOPA-PET assessment in MPTP-hemiparkinsonian monkeys. *Exp.Neurol.* 1996, 141:318-329.

[288] Messiha FS, Martin WJ, Bucher KD. Behavioral and genetic interrelationships between locomotor activity and brain biogenic amines. *Gen.Pharmacol.* 1990, 21:459-464.

[289] Middleton FA, Strick PL. Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res.Rev.* 2000, 31:236-250.

[290] Mikkelsen M, Moller A, Jensen LH, Pedersen A, Harajehi JB, Pakkenberg H. MPTP-induced parkinsonism in minipigs: A behavioral, biochemical, and histological study. *Neurotoxicol.Teratol.* 1999, 21:169-175.

[291] Miller DB, Ali SF, O'Callaghan JP, Laws SC. The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1998, 844:153-165.

[292] Miller DB, Reinhard JFJ, Daniels AJ, O'Callaghan JP. Diethyldithiocarbamate potentiates the neurotoxicity of in vivo 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and of in vitro 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J.Neurochem.* 1991, 57:541-549.

[293] Miller GW, Gainetdinov RR, Levey AI, Caron MG. Dopamine transporters and neuronal injury. *Trends.Pharmacol.Sci.* 1999, 20:424-429.

[294] Mitra N, Mohanakumar KP, Ganguly DK. Dissociation of serotoninergic and dopaminergic components in acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Brain Res.Bull.* 1992, 28:355-364.

[295] Mitsuhata C, Kitayama S, Morita K, Vandenbergh D, Uhl GR, Dohi T. Tyrosine-533 of rat dopamine transporter: involvement in interactions with 1-methyl-4-phenylpyridinium and cocaine. *Mol.Brain Res.* 1998, 56:84-88.

[296] Mitsumoto Y, Watanabe A, Mori A, Koga N. Spontaneous regeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons in MPTP-treated C57BL/6 mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998, 248:660-663.

[297] Mitsuo K, Schwartz JP. Somatostatin content increases following norepinephrine depletion in frontal cortex of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *J.Neurochem.* 1992, 59:267-272.

[298] Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui D-H, Tabira T. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J.Neurosci.* 2000, 20:1568-1574.

[299] Mizuno Y, Hattori N, Matsumine H. Neurochemical and neurogenetic correlates of Parkinson's disease. *J.Neurochem.* 1998, 71:893-902.

[300] Mizuno Y, Suzuki K, Sone N, Saitoh T. Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain in vivo. *Neurosci.Lett.* 1988, 91:349-353.

[301] Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, Hattori N, Kobayashi T, Shimoda MS, Matsumine H, Kondo T. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 1998, 44:S99-S109

[302] Mogi M, Harada M, Kojima K, Kiuchi K, Nagatsu T. Effects of systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to mice on tyrosine hydroxylase, L-3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase, and monoamine oxidase activities in the striatum and hypothalamus. *J.Neurochem.* 1988, 50:1053-1056.

[303] Mohanakumar KP, Muralikrishnan D, Thomas B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Res.* 2000, 864:281-290.

[304] Moisan M-P. From QTL detection to gene identification. In: Jones BC, Mormede P, eds. Neurobehavioral Genetics: Methods and applications. Boca Raton: CRC Press, 1999:77-91.

[305] Moy LY, Albers DS, Sonsalla PK. Lowering ambient or core body temperature elevates striatal MPP plus levels and enhances toxicity to dopamine neurons in MPTP-treated mice. *Brain Res.* 1998, 790:264-269.

[306] Muralikrishnan D, Mohanakumar KP. Neuroprotection by bromocriptine against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in mice. *FASEB Journal* 1998, 12:905-912.

[307] Muthane U, Ramsay KA, Jiang H, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Fernando S, Ferreira M, Przedborski S. Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. *Exp.Neurol.* 1994, 126:195-204.

[308] Nagatsu T. Isoquinoline neurotoxins in the brain and Parkinson's disease. *Neurosci.Res.* 1997, 29:99-111.

[309] Naoi M, Maruyama W, Matsubara K, Hashizume Y. A neutral N-methyltransferase activity in the striatum determines the level of an endogenous MPP+-like neurotoxin, 1,2-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium ion, in the substantia nigra of human brains. *Neurosci.Lett.* 1997, 235:81-84.

[310] Ng MC, Iacopino AM, Quintero EM, Marches F, Sonsalla PK, Liang CL, Speciale SG, German DC. The neurotoxin MPTP increases calbindin-D28k levels in mouse midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1996, 36:329-336.

[311] Nicholl DJ, Bennett P, Hiller L, Bonifati V, Vanacore N, Fabbrini G, Marconi R, Colosimo C, Lamberti P, Stocchi F, Bonuccelli U, Vieregge P, Ramsden DB, Meco G, Williams AC. A study of five candidate genes in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Neurology* 1999, 53:1415-1421.

[312] Nikulina EM, Skrinskaya JA, Popova NK. Role of genotype and dopamine receptors in behaviour of inbred mice in a forced swimming test. *Psychopharmacology* 1991, 105:525-529.

[313] Nishi K, Kondo T, Narabayashi H. Destruction of norepinephrine terminals in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice reduces locomotor activity induced by L-dopa. *Neurosci.Lett.* 1991, 123:244-247.

[314] Nussbaum RL. Human genetics - Putting the Parkin into Parkinson's. *Nature* 1998, 392:544-545.

[315] Nussbaum RL, Polymeropoulos MH. Genetics of Parkinson's disease. *Hum.Mol.Genet.* 1997, 6:1687-1691.

[316] Offen D, Beart PM, Cheung NS, Pascoe CJ, Hochman A, Gorodin S, Melamed E, Bernard R, Bernard O. Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998, 95:5789-5794.

[317] Ogawa N, Hirose Y, Ohara S, Ono T, Watanabe Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 1985, 50:435-441.

[318] Ogawa N, Mizukawa K, Hirose Y, Kajita S, Ohara S, Watanabe Y. MPTP-induced parkinsonian model in mice: biochemistry, pharmacology and behavior. *Eur.Neurol.* 1987, 26 Suppl 1:16-23.

[319] Ohno Y, Ishida K, Ikeda K, Ishibashi T, Okada K, Mitsutaka N. Evaluation of Bradykinesia induction by SM-9018, a novel 5-HT2 and D2 receptor antagonist, using the mouse pole test. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1994, 49:19-23.

[320] Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B. alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J.Neurosci.* 1999, 19:5782-5791.

[321] Panoutsakopoulou V, Spring P, Cort L, Sylvester JE, Blank KJ, Blankenhorn EP. Microsatellite typing of CXB recombinant inbred and parental mouse strains. *Mamm.Genome* 1997, 8:357-361.

[322] Peeler DF. Two measures of activity in genetically defined mice as a function of strain, time of day, and previous experience. *Psychobiology* 1990, 18:327-338.

[323] Peroutka SJ, Delanney L, Irwin I, Ison PJ, Ricaurte G, Schlegel JR, Langston JW. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) induced dopamine D2 receptor hypersensitivity in the mouse is transient. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 1985, 48:163-171.

[324] Petrucelli L, Ostrerova N, Muja N, DeVries G, Mehta N, Farrer MJ, Hardy J, Wolozin B. Mutations in alpha-synuclein exhibit vulnerability to free radical damage. Soc.Neurosci.Abstr. 1998, 24:968.

[325] Pfaff DW. Hormones, genes, and behavior. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997, 94:14213-14216.

[326] Phelan JP, Austad SN. Selecting animal models of human aging: inbred strains often exhibit less biological uniformity than F1 hybrids. *J Gerontol.* 1994, 49:B1-11.

[327] Phillips TJ, Lessov CN, Harland RD, Mitchell SR. Evaluation of potential genetic associations between ethanol tolerance and sensitization in BXD/Ty recombinant inbred mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1996, 277:613-623.

[328] Picciotto MR, Wickman K. Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiol.Rev.* 1998, 78:1131-1163.

[329] Pileblad E, Nissbrandt H, Carlsson A. Biochemical and functional evidence for a marked dopamine releasing action of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (NMPTP) in mouse brain. *J.Neural Transm.* 1984, 60:199-203.

[330] Pitts SM, Markey SP, Murphy DL, Weisz A. Recommended practices for the safe handling of MPTP. In: Markey SP, Castagnoli N Jr., Trevor AJ, Kopin IJ, eds. MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. Orlando: Academic Press, 1986:703-716.

[331] Platel A, Porsolt RD. Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. *Psychopharmacology Berl.* 1982, 78:346-352.

[332] Platel A, Strolin-Benedetti M, Guffroy C. MPTP-induced decrease in motor activity in two strains of mice: Its reversal by different monoamine oxidase inhibitors (MAOIs). In: Markey SP, Castagnoli N Jr., Trevor AJ, Kopin IJ, eds. MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. Orlando: Academic Press, 1986:443-447.

[333] Poeck K. Neurologie. 8. Auflage. Berlin: Springer, 1992:

[334] Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996, 274:1197-1199.

[335] Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997, 276:2045-2047.

[336] Przedborski S, Jackson-Lewis V. Mechanisms of MPTP toxicity. *Movement Disorders* 1998, 13 Suppl. 1:35-38.

[337] Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, Almer G. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restorative Neurol.Neurosci.* 2000, 16:135-142.

[338] Puglisi-Allegra S, Cabib S. Psychopharmacology of dopamine: the contribution of comparative studies in inbred strains of mice. *Prog.Neurobiol.* 1997, 51:637-661.

[339] Rabey JM, Hefti F. Neuromelanin synthesis in rat and human substantia nigra. *J.Neural Transm.Park.Dis.Dement.Sect.* 1990, 2:1-14.

[340] Rasmussen E, Cipp L, Hitzemann R. Identification of quantitative trait loci for haloperidol-induced catalepsy on mouse chromosome 14. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 1999, 290:1337-1346.

[341] Riachi NJ, Behmand RA, Harik SI. Correlation of MPTP neurotoxicity in vivo with oxidation of MPTP by the brain and blood-brain barrier in vitro in five rat strains. *Brain Res.* 1991, 555:19-24.

[342] Riachi NJ, Harik SI. Strain differences in systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in mice correlate best with monoamine oxidase activity at the blood-brain barrier. *Life Sci.* 1988, 42:2359-2363.

[343] Riachi NJ, Harik SI, Kalaria RN, Sayre LM. On the mechanisms underlying 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. II. Susceptibility among mammalian species correlates with the toxin's metabolic patterns in brain microvessels and liver. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1988, 244:443-448.

[344] Ricaurte GA, Irwin I, Forno LS, Delanney LE, Langston E, Langston JW. Aging and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Brain Res.* 1987, 403:43-51.

[345] Rios M, Habecker B, Sasaoka T, Eisenhofer G, Tian H, Landis S, Chikaraishi D, Roffler TS. Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase. *J.Neurosci.* 1999, 19:3519-3526.

[346] Rodgers RJ, Cole JC. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol.Behav.* 1993, 54:729-736.

[347] Rodgers RJ, Nikulina EM, Cole JC. Dopamine D1 and D2 receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1994, 49:985-995.

[348] Rogers DC, Jones DNC, Nelson PR, Jones CM, Quilter CA, Robinson TL, Hagan JJ. Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behav.Brain Res.* 1999, 105:207-217.

[349] Rosland JH, Hunskaar S, Broch OJ, Hole K. Acute and long term effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in tests of nociception in mice. *Pharmacol.Toxicol.* 1992, 70:31-37.

[350] Ross RA, Judd AB, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ. Strain-dependent variations in number of midbrain dopaminergic neurones. *Nature* 1976, 264:654-656.

[351] Royle SJ, Collins FC, Rupniak HT, Barnes JC, Anderson R. Behavioural analysis and susceptibility to CNS injury of four inbred strains of mice. *Brain Res.* 1999, 816:337-349.

[352] Rozas G, Liste I, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Sprouting of the serotonergic afferents into striatum after selective lesion of the dopaminergic system by MPTP in adult mice. *Neurosci.Lett.* 1998, 245:151-154.

[353] Rozas G, López-Martin E, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J.Neurosci.Methods* 1998, 83:165-175.

[354] Rudolph U, Mohler H. Genetically modified animals in pharmacological research: future trends. *Eur.J Pharmacol.* 1999, 375:327-337.

[355] Sanberg PR, Martinez R, Shytle RD, Cahill DW. The Catalepsy Test. In: Sanberg PR, Ossenkopp KP, Kavaliers M, eds. Motor Activity and Movement Disorders. Totowa: Humana Press, 1996:197-211.

[356] Sanghera MK, Crespi F, Martin KF, Heal DJ, Buckett WR, Marsden CA. Biochemical and in vivo voltammetric evidence for differences in striatal dopamine levels in inbred strains of mice. *Neuroscience* 1990, 39:649-656.

[357] Sanghera MK, Manaye K, McMahon A, Sonsalla PK, German DC. Dopamine transporter mRNA levels are high in midbrain neurons vulnerable to MPTP. *Neuroreport.* 1997, 8:3327-3331.

[358] Sanghera MK, Manaye KF, Liang CL, Iacopino AM, Bannon MJ, German DC. Low dopamine transporter mRNA levels in midbrain regions containing calbindin. *Neuroreport* 1994, 5:1641-1644.

[359] Sano A, Miyaji M, Nishimura K. Studies on the relationship between the estrous cycle of BALB/c mice and their resistance to Paracoccidioides brasiliensis infection. *Mycopathologia* 1992, 119:141-145.

[360] Satoh N, Yonezawa A, Tadano T, Kisara K, Arai Y, Kinemuchi H. Acute effects of a parkinsonism-inducing neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on mouse body temperature. *Life Sci.* 1987, 41:1415-1424.

[361] Schapira AH, Mann VM, Cooper JM, Krige D, Jenner PJ, Marsden CD. Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 1992, 32 Suppl:S116-124.

[362] Schmidt MJ, Sawyer BD, Perry KW, Fuller RW, Foreman MM, Ghetti B. Dopamine deficiency in the weaver mutant mouse. *J.Neurosci.* 1982, 2:376-380.

[363] Schneider JS, Rothblat DS, Distefano L. Volume transmission of dopamine over large distances may contribute to recovery from experimental parkinsonism. *Brain Res.* 1994, 643:86-91.

[364] Schork NJ, Nath SP, Lindpaintner K, Jacob HJ. Extensions to quantitative trait locus mapping in experimental organisms. *Hypertension* 1996, 28:1104-1111.

[365] Schroeder U, Kreutz MR, Schroeder H, Sabel BA. Amphetamine induces hypermotility in MPTP-lesioned mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1997, 56:281-285.

[366] Schulz JB, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in movement disorders. *Curr.Opin.Neurol.* 1994, 7:333-339.

[367] Schulz JB, Matthews RT, Klockgether T, Dichgans J, Beal MF. The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. *Mol.Cell Biochem.* 1997, 174:193-197.

[368] Schwarting R. Zur Neurochemie des Verhaltens: Dopamin und Motivation. *Psychologische Rundschau* 1997, 48:211-223.

[369] Schwarting R, Huston JP. Short-term effects of ether, equithesin and droperidol/fentanyl on catecholamine and indolamine metabolism in the brain of the rat. *Neuropharmacology* 1987, 26:457-461.

[370] Schwarting, R. K. W. Neurochemische Korrelate von Verhalten: Analyse dopaminerger Systeme im Gehirn der Ratte. Dissertation, Universität Düsseldorf, 1987.

[371] Schwarting RKW, Huston JP. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog.Neurobiol.* 1996, 50:275-331.

[372] Schwarting RKW, Huston JP. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog.Neurobiol.* 1996, 49:215-266.

[373] Schwarting RKW, Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Huston JP. Strain-dependent recovery of open-field behavior and striatal dopamine deficiency in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 1999, 1:41-56.

[374] Scotcher KP, Irwin I, Delanney LE, Langston JW, Di Monte D. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on ATP levels of mouse brain synaptosomes. *J.Neurochem.* 1998, 54:1295-1301.

[375] Selby G. Clinical features. In: Stern GM, ed. Parkinson's disease. London: Chapman and Hall, 1990:333-388.

[376] Serra MJ, Ring HA. Vulnerability to emotionally negative stimuli in Parkinson's disease: An investigation using the Emotional Stroop Task. *Neuropsychiatry Neuropsychology and Behavioral Neurology* 1999, 12:52-57.

[377] Sershen H, Hashim A, Lajtha A. Behavioral and biochemical effects of nicotine in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1987, 28:299-303.

[378] Sershen H, Hashim A, Wiener HL, Lajtha A. Effect of chronic oral nicotine on dopaminergic function in the MPTP-treated mouse. *Neurosci.Lett.* 1988, 93:270-274.

[379] Severson JA, Randall PK, Finch CE. Genotypic influences on striatal dopaminergic regulation in mice. *Brain Res.* 1981, 210:201-215.

[380] Sherwin CM. Preferences of individually housed TO strain laboratory mice for loose substrate or tubes for sleeping. *Lab.Anim.* 1996, 30:245-251.

[381] Sherwin CM. Observations on the prevalence of nest-building in non-breeding TO strain mice and their use of two nesting materials. *Lab.Anim.* 1997, 31:125-132.

[382] Shi H, Noguchi N, Xu Y, Niki E. 1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium is transformed by ubiquinone to the selective nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. *FEBS Lett.* 1999, 461:196-200.

[383] Shiozaki S, Ichikawa S, Nakamura J, Kitamura S, Yamada K, Kuwana Y. Actions of adenosine A2A receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. *Psychopharmacology* 1999, 147:90-95.

[384] Siegfried B, Bures J. Handedness in rats: blockade of reaching behavior by unilateral 6-OHDA injections into substantia nigra and caudate nucleus. *Physiol.Behav.* 1980, 8:360-368.

[385] Sikiric P, Marovic A, Matoz W, Anic T, Buljat G, Mikus D, Stancic RD, Separovic J, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Ziger T, Sebecic B, Zoricic I, Turkovic B, Aralica G, Perovic D, Duplancic B, Lovric BM, Rotkvic I, Mise S, Jagic V, Hahn V. A behavioural study of the effect of pentadecapeptide BPC 157 in Parkinson's disease models in mice and gastric lesions induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydrophyridine. *J.Physiol.Paris.* 1999, 93:505-512.

[386] Simon JR, Ghetti B. The weaver mutant mouse as a model of nigrostriatal dysfunction. *Mol.Neurobiol.* 1994, 9:183-189.

[387] Skrinskaya JA, Nikulina EM, Popova NK. Role of genotype in brain dopamine metabolism and dopamine-dependent behavior of mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1992, 42:261-267.

[388] Sluyter F, Marican CM, Crusio WE. Further phenotypical characterisation of two substrains of C57BL/6J inbred mice differing by a spontaneous single-gene mutation. *Behav.Brain Res.* 1999, 98:39-43.

[389] Smith TS, Swerdlow RH, Parker WD Jr., Bennett JP Jr. Reduction of MPP(+)-induced hydroxyl radical formation and nigrostriatal MPTP toxicity by inhibiting nitric oxide synthase. *Neuroreport* 1994, 5:2598-2600.

[390] Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 1998, 86:353-387.

[391] Snow BJ, Vingerhoets FJG, Langston JW, Tetrud JW, Sossi V, Calne DB. Pattern of dopaminergic loss in the striatum of humans with MPTP induced parkinsonism. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 2000, 68:313-316.

[392] Sokolowski AL, Larsson BS, Lindquist NG. Distribution of 1-(3H)-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (3H-MPTP) in the frog: uptake in neuromelanin. *Pharmacol.Toxicol.* 1990, 66:252-258.

[393] Sommer B, Pierrat-Sturchler C, Abramowksi D, Wiederhold K-H, Calhoun M, Jucker M, Kelly P, Staufenbiel M. Transgenic approaches to model Alzheimer's disease. *Rev.Neurosci.* 2000, 11:47-51.

[394] Song DD, Haber SN. Striatal responses to partial dopaminergic lesion: Evidence for compensatory sprouting. *J Neurosci* 2000, 20:5102-5114.

[395] Sonsalla PK, Albers DS, Zeevalk GD. Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids* 1998, 14:69-74.

[396] Sonsalla PK, Heikkila RE. The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Eur.J.Pharmacol.* 1986, 129:339-345.

[397] Sonsalla PK, Heikkila RE. Neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and methamphetamine in several strains of mice. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 1988, 12:345-354.

[398] Sonsalla PK, Jochnowitz ND, Zeevalk GD, Oostveen JA, Hall ED. Treatment of mice with methamphetamine produces cell loss in the substantia nigra. *Brain Res.* 1996, 738:172-175.

[399] Spacey SD, Wood NW. The genetics of Parkinson's disease. *Curr.Opin.Neurol.* 1999, 12:427-432.

[400] Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998, 95:6469-6473.

[401] Spooren WPJM, Vassout A, Waldmeier P, Gentsch C. Differences in pre- and post-synaptic sensitivity to apomorphine between saline and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57BL/6 mice as reflected in climbing activity. *Eur.J.Pharmacol.* 1998, 353:1-4.

[402] Staal RGW, Hogan KA, Liang CL, German DC, Sonsalla PK. In vitro studies of striatal vesicles containing the vesicular monoamine transporter (VMAT2): Rat versus mouse differences in sequestration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2000, 293:329-335.

[403] Steiner H, Fuchs S, Accili D. D3 dopamine receptor-deficient mouse: evidence for reduced anxiety. *Physiol.Behav.* 1997, 63:137-141.

[404] Stenström A, Sundström E, Fowler CJ. Comparison of intra- and extrasynaptosomal monoamine oxidase-A and -B activities in the striatum and frontal cortex of two mice strains with different sensitivities to the neurotoxic actions of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Pharmacol.Toxicol.* 1989, 64:276-281.

[405] Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J.Neurosci.Res.* 1999, 55:659-665.

[406] Stone M. Neurobiology - Jumbo gene offers clue to Parkinson's. *Science* 1998, 280:203-203.

[407] Sundström E, Fredriksson A, Archer T. Chronic neurochemical and behavioral changes in MPTP-lesioned C57BL/6 mice: a model for Parkinson's disease. *Brain Res.* 1990, 528:181-188.

[408] Sundström E, Henriksson BG, Mohammed AH, Souverbie F. MPTP-treated mice: A useful model for Parkinson's disease? In: Woodruff ML, Nonneman AJ, eds. Toxin-induced models of neurological disorders. New York: Plenum, 1994:181-188.

[409] Sundström E, Samuelsson EB. Comparison of key steps in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in rodents. *Pharmacol.Toxicol.* 1997, 81:226-231.

[410] Sundström E, Strömberg I, Tsutsumi T, Olson L, Jonsson G. Studies on the effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in C57BL/6 mice. Comparison with three other strains of mice. *Brain Res.* 1987, 405:26-38.

[411] Sved AF, Baker HA, Reis DJ. Dopamine synthesis in inbred mouse strains which differ in numbers of dopamine neurons. *Brain Res.* 1984, 303:261-266.

[412] Swerdlow RH, Parks JK, Davis JN, Cassarino DS, Trimmer PA, Currie LJ, Dougherty J, Bridges WS, Bennett JP Jr., Wooten GF, Parker WD. Matrilineal inheritance of complex I dysfunction in a multigenerational Parkinson's disease family. *Ann.Neurol.* 1998, 44:873-881.

[413] Tabatabaei A, Perry TL, Hansen S, Krieger C. Partial protective effect of MK-801 on MPTP-induced reduction of striatal dopamine in mice. *Neurosci.Lett.* 1992, 141:192-194.

[414] Tadano T, Satoh N, Sakuma I, Matsumura T, Kisara K, Arai Y, Kinemuchi H. Behavioral and biochemical changes following acute administration of MPTP and MPP+. *Life Sci.* 1987, 40:1309-1318.

[415] Takada M, Sugimoto T, Hattori T. MPTP neurotoxicity to cerebellar Purkinje cells in mice. *Neurosci.Lett.* 1993, 150:49-52.

[416] Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Uhl GR. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997, 94:9938-9943.

[417] Takahashi RN, Rogerio R, Zanin M. Maneb enhances MPTP neurotoxicity in mice. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 1989, 66:167-170.

[418] Tanila H, Bjorklund M, Riekkinen P. Cognitive changes in mice following moderate MPTP exposure. *Brain Res.Bull.* 1998, 45:577-582.

[419] Tariq M, Khan HA, Al Moutaery K, Al Deeb SM. Effect of chronic administration of magnesium sulfate on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in mice. *Pharmacol.Toxicol.* 1998, 82:218-222.

[420] Tasaki Y, Makino Y, Ohta S, Hirobe M. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, decreasing in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mouse, prevents parkinsonism-like behavior abnormalities. *J.Neurochem.* 1991, 57:1940-1943.

[421] Taylor AE, Saint Cyr JA. The neuropsychology of Parkinson's disease. *Brain Cogn.* 1995, 28:281-296.

[422] Taylor JR, Elsworth JD, Roth RH, Sladek JR Jr., Redmond DE Jr. Severe long-term 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the vervet monkey (Cercopithecus aethiops sabaeus). *Neuroscience* 1997, 81:745-755.

[423] Tetrud JW, Langston JW. Tremor in MPTP-induced parkinsonism. *Neurology* 1992, 42:407-410.

[424] Thiel, C. M. Zur Neurochemie des Verhaltens: Acetylcholin, Motivation und die Rolle von Erfahrungen. Dissertation, Universität Düsseldorf, 1999.

[425] Tief K, Schmidt A, Beermann F. New evidence for presence of tyrosinase in substantia nigra, forebrain and midbrain. *Mol.Brain Res.* 1998, 53:307-310.

[426] Tolwani RJ, Jakowec MW, Petzinger GM, Green S, Waggie K. Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models. *Lab.Anim.Sci.* 1999, 49:363-371.

[427] Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* 1995, 373:335-339.

[428] Triarhou LC, Ghetti B. Neuroanatomical substrate of behavioural impairment in weaver mutant mice. *Exp.Brain Res.* 1987, 68:434-436.

[429] Trimmer PA, Smith TS, Jung AB, Bennett JP Jr. Dopamine neurons from transgenic mice with a knockout of the p53 gene resist MPTP neurotoxicity. *Neurodegeneration* 1996, 5:233-239.

[430] Trullas R, Skolnick P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology Berl.* 1993, 111:323-331.

[431] Tsai YF, Tsai HW, Tai MY, Lu KS. Age-related changes in locomotor behavior induced by MPTP in rats. *Neurosci.Lett.* 1991, 129:153-155.

[432] Turri MG, Talbot CJ, Radcliffe RA, Wehner JM, Flint J. High-resolution mapping of quantitative trait loci for emotionality in selected strains of mice. *Mamm.Genome* 1999, 10:1098-1101.

[433] Uhl GR. Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 1998, 43:555-560.

[434] Unzeta M, Baron S, Perez V, Ambrosio S, Mahy N. Sex-related effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment may be related to differences in monoamine oxidase B. *Neurosci.Lett.* 1994, 176:235-238.

[435] Valentinuzzi VS, Kolker DE, Vitaterna MH, Shimomura K, Whiteley A, Low ZS, Turek FW, Ferrari EA, Paylor R, Takahashi JS. Automated measurement of mouse freezing behavior and its use for quantitative trait locus analysis of contextual fear conditioning in (BALB/cJ x C57BL/6J)F2 mice. *Learn.Mem.* 1998, 5:391-403.

[436] van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, Kauffmann S, Hofele K, Spooren WPJM, Ruegg MA, Lin S, Caroni P, Sommer B, Tolnay M, Bilbe G. Neuropathology in Mice Expressing Human alpha-Synuclein. *J Neurosci* 2000, 20:6021-6029.

[437] Van Hartesveldt C, Joyce JN. Effects of estrogen on the basal ganglia. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 1986, 10:1-14.

[438] Vidal J. Differences of nu/+ and nu/nu mice in some behaviors reflecting temperament traits. *Physiology and Behavior* 1996, 59:341-348.

[439] Vidal J, Fuste A. Antibody response and some behaviors as differential traits between two inbred strains of mice (C57BL/6 and BALB/c). *Psychol.Rep.* 1993, 72:111-120.

[440] Vieregge P. Genetic factors in the etiology of idiopathic Parkinson's disease. *J.Neural Transm.Park.Dis.Dement.Sect.* 1994, 8:1-37.

[441] Vrijmoed de Vries MC, Tonissen H, Cools AR. The relationship between hindlimb disturbances, forelimb disturbances and catalepsy after increasing doses of muscimol injected into the striatal-pallidal complex. *Psychopharmacology Berl.* 1987, 92:73-77.

[442] Wagner GC, Jarvis MF, Rubin JG. L-dopa reverses the effects of MPP+ toxicity. *Psychopharmacology Berl.* 1986, 88:401-402.

[443] Wagner GC, Walsh SL. Increased sensitivity of mice to tremorogenic agents following MPP+. *Psychopharmacology Berl.* 1987, 92:470-472.

[444] Wakana S, Sugaya E, Naramoto F, Yokote N, Maruyama C, Jin W, Ohguchi H, Tsuda T, Sugaya A, Kajiwara K. Gene mapping of SEZ group genes and determination of pentylenetetrazol susceptible quantitative trait loci in the mouse chromosome. *Brain Res.* 2000, 857:286-290.

[445] Walters TL, Irwin I, Delfani K, Langston JW, Janson AM. Diethyldithiocarbamate causes nigral cell loss and dopamine depletion with nontoxic doses of MPTP. *Exp.Neurol.* 1999, 156:62-70.

[446] Watanabe C, Satoh H. Effects of prolonged selenium deficiency on open field behavior and Morris water maze performance in mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1995, 51:747-752.

[447] Webster KE. The functional anatomy of the basal ganglia. In: Stern GM, ed. Parkinson's disease. London: Chapman and Hall, 1990:3-56.

[448] Wehner JM, Radcliffe RA, Rosmann ST, Christensen SC, Rasmussen DL, Fulker DW, Wiles M. Quantitative trait locus analysis of contextual fear conditioning in mice. *Nat.Genet.* 1997, 17:331-334.

[449] Weihmuller FB, Hadjiconstantinou M, Bruno JP. Acute stress or neuroleptics elicit sensorimotor deficits in MPTP-treated mice. *Neurosci.Lett.* 1988, 85:137-142.

[450] Weihmuller FB, Hadjiconstantinou M, Bruno JP. Dissociation between biochemical and behavioral recovery in MPTP-treated mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1989, 34:113-117.

[451] Weihmuller FB, Hadjiconstantinou M, Bruno JP. Dopamine receptors and sensorimotor behavior in MPTP-treated mice. *Behav.Brain Res.* 1990, 38:263-273.

[452] Weihmuller FB, Hadjiconstantinou M, Bruno JP, Neff NH. Administration of GM1 ganglioside eliminates neuroleptic-induced sensorimotor deficits in MPTP-treated mice. *Neurosci.Lett.* 1988, 92:207-212.

[453] Weihmuller FB, Hadjiconstantinou M, Bruno JP, Neff NH. Continued administration of GM1 ganglioside is required to maintain recovery from neuroleptic-induced sensorimotor deficits in MPTP-treated mice. *Life Sci.* 1989, 45:2495-2502.

[454] Welch WJ, Gambetti P. Chaperoning brain diseases. *Nature* 1998, 392:23-24.

[455] Wichmann T, DeLong MR. Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr.Opin.Neurobiol.* 1996, 6:751-758.

[456] Wiener HL, Lajtha A, Sershen H. Dopamine D1 receptor and dopamine D2 receptor binding activity changes during chronic administration of nicotine in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *Neuropharmacology* 1989, 28:535-537.

[457] Wilhelmsen K, Mirel D, Marder K, Bernstein M, Naini A, Leal SM, Cote LJ, Tang MX, Freyer G, Graziano J, Mayeux R. Is there a genetic susceptibility locus for Parkinson's disease on chromosome 22q13? *Ann.Neurol.* 1997, 41:813-817.

[458] Williams A. MPTP toxicity: clinical features. *J.Neural Transm.Suppl.* 1986, 20:5-9.

[459] Willis GL, Donnan GA. Histochemical, biochemical and behavioural consequences of MPTP treatment in C-57 black mice. *Brain Res.* 1987, 402:269-274.

[460] Willis GL, Horne MK, Donnan GA. Amine accumulation, catecholamine depletion and motor impairment in Macaca fasicularis and the C-57 black mouse after MPTP administration. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 1988, 12:469-482.

[461] Wooten GF, Currie LJ, Bennett JP, Harrison MB, Trugman JM, Parker WD Jr. Maternal inheritance in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 1997, 41:265-268.

[462] Wullner U, Kornhuber J, Weller M, Schulz JB, Loschmann PA, Riederer P, Klockgether T. Cell death and apoptosis regulating proteins in Parkinson's disease - a cautionary note. *Acta Neuropathol.* 1999, 97:408-412.

[463] Yamamoto M, Kondo I, Ogawa N, Asanuma M, Yamashita Y, Mizuno Y. Genetic association between susceptibility to Parkinson's disease and alpha1-antichymotrypsin polymorphism. *Brain Res.* 1997, 759:153-155.

[464] Yanagisawa N. Historical review of research on functions of basal ganglia. *Eur.Neurol.* 1996, 36 Suppl 1:2-8.

[465] Yang L, Matthews R.T., Schulz JB, Klockgether T, Liao AW, Martinou J-C, Penney JBJ, Hyman BT, Beal MF. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyride neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing bcl-2. *J.Neurosci.* 1998, 18:8145-8152.

[466] Yang SC, Markey SP, Bankiewicz KS, London WT, Lunn G. Recommended safe practices for using the neurotoxin MPTP in animal experiments. *Lab.Anim.Sci.* 1988, 38:563-567.

[467] Yokoyama T, Silversides DW, Waymire KG, Kwon BS, Takeuchi T, Overbeek PA. Conserved cysteine to serine mutation in tyrosinase is responsible for the classical albino mutation in laboratory mice. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18:7293-7298.

[468] Yoshihara S, Harada K, Ohta S. Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in perfused rat liver: Involvement of hepatic aldehyde oxidase as a detoxification enzyme. *Drug metabolism and disposition* 2000, 28:538-543.

[469] Youdim MBH, Dhariwal K, Levine M, Markey CJ, Markey S, Caohuy H, Adeyemo OM, Pollard HB. MPTP-induced "parkinsonism" in the goldfish. *Neurochem.Int.* 1992, 20 Supplement:275S-278S.

[470] Yurek DM, Deutch AY, Roth RH, Sladek JR Jr. Morphological, neurochemical, and behavioral characterizations associated with the combined treatment of diethyldithiocarbamate and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Brain Res.* 1989, 497:250-259.

[471] Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM. Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci.* 1990, 13:290-296.

[472] Zimmer J, Geneser FA. Difference in monoamine oxidase B activity between C57 black and albino NMRI mouse strains may explain differential effects of the neurotoxin MPTP. *Neurosci.Lett.* 1987, 78:253-258.

[473] Zuddas A, Vaglini F, Fornai F, Corsini GU. Selective lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway by MPTP and acetaldehyde or diethyldithiocarbamate. *Neurochem.Int.* 1992, 20 Suppl:287S-293S.

7 Abkürzungsverzeichnis

alb: albino (= unpigmentiert)
AMPH: Amphetamin
APO: Apomorphin
COMT: Catechol-O-Methyltransferase
DA: Dopamin
DAT: Membran-Dopamintransporter
DHBA: Dihydroxybenzylamin
DNS: Desoxyribonukleinsäure
DOPAC: Dihydroxyphenylessigsäure
HPLC: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
5-HT: Serotonin (5-Hydroxytryptamin)
HVA: Homovanillinsäure
i.p.: intraperitoneal
KO: Knockout
KSL: physiologische Kochsalzlösung
M: Männchen
MAO: Monoamin-Oxidase
3-MT: 3-Methoxytyramin
$MPDP^+$: 1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium
MPP^+: 1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPTP: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MPTP2x20x2: 2 i.p. Injektionen im 2-Stunden-Abstand von je 20 mg MPTP-HCl/kg Körpergewicht an zwei aufeinanderfolgenden Tagen
MPTP4x10: 4 i.p. Injektionen im 2-Stunden-Abstand von je 10 mg MPTP-HCl/kg Körpergewicht
MPTP4x15: 4 i.p. Injektionen im 2-Stunden-Abstand von je 15 mg MPTP-HCl/kg Körpergewicht
MPTP4x20: 4 i.p. Injektionen im 2-Stunden-Abstand von je 20 mg MPTP-HCl/kg Körpergewicht
NA: Noradrenalin
Nacc: Nucleus accumbens
NMDA: N-Methyl-D-Aspartat
6-OHDA: 6-Hydroxydopamin
PD: Morbus Parkinson (Parkinson' s disease)
pig: pigmentiert
QTL(s): Quantitative Trait Locus/Quantitative Trait Loci
TH: Tyrosinhydroxylase
Tukey's HSD: Tukey's honest significant difference Test
TVA: Tierversuchsanlage
Tyr+: C57BL/6J (Tyrosinase-positiv)
Tyr-: C57BL/6J-*Tyr^{c-2J}* (Tyrosinase-negativ)
VMAT: vesikulärer Monoamintransporter
VTA: Area ventralis tegmentalis
W: Weibchen

Anhang

Tabelle A-1. Poletest, Vorversuch: Latenzen bis zur ersten Bewegung (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c. Die Tiere erhielten keinerlei Behandlung.

	C57BL/6		BALB/c	
	Männchen (n=10)	**Weibchen (n=10)**	**Männchen (n=10)**	**Weibchen (n=10)**
Tag 1	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.3	12.5 ± 9.6	5.7 ± 3.1
Tag 2	2.4 ± 2.4	0.1 ± 0.1	7.5 ± 3.5	2.8 ± 1.2

Tabelle A-2. Pole-Test, Parentalgeneration: relativer Anteil der Tiere, die die Stange während der Beobachtungszeit verlassen haben. Getestet wurden Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	C57BL/6				BALB/c			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=10)	**MPTP (n=13)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=11)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=13)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=12)**
Tag 1	100%	38%	100%	18%	50%	46%	70%	58%
Tag 2	100%	77%	100%	45%	30%	62%	60%	100%
Tag 3	90%	85%	90%	100%	20%	46%	60%	100%
Tag 4	90%	92%	90%	91%	10%	54%	60%	83%

Tabelle A-3. Pole-Test, Parentalgeneration: Anzahl ganzer Drehungen (Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen und Weibchen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	C57BL/6				BALB/c			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=10)	**MPTP (n=13)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=11)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=13)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=12)**
Tag 1	1.8 ± 0.6	1.2 ± 0.6	1.2 ± 0.2	0.4 ± 0.2	1.5 ± 0.5	2.4 ± 1.1	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.3
Tag 2	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.3	1.5 ± 0.4	0.6 ± 0.2	2.9 ± 0.8	2.0 ± 0.6	4.4 ± 1.5	1.0 ± 0.0
Tag 3	1.9 ± 0.9	1.2 ± 0.2	1.8 ± 0.8	1.5 ± 0.5	4.8 ± 1.0	2.8 ± 0.9	7.1 ± 2.7	1.6 ± 0.4
Tag 4	2.5 ± 1.1	1.7 ± 0.7	1.9 ± 0.9	2.3 ± 1.3	6.1 ± 1.6	4.4 ± 1.4	6.8 ± 2.6	2.0 ± 0.7

Tabelle A-4: Produkt-Moment-Korrelationen zwischen Verhaltensparametern im Offenfeld und neuralen Parametern, Parentalgeneration. Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten für Mäuse der Stämme C57BL/6 und BALB/c, die eine Behandlung mit Kochsalzlösung erhalten hatten.

	Tag 1		**Tag 2**		**Tag 3**		**Tag 4**	
	Loko-motion	**Aufrich-tungen**	**Loko-motion**	**Aufrich-tungen**	**Loko-motion**	**Aufrich-tungen**	**Loko-motion**	**Aufrich-tungen**
C57BL/6 (n=19)								
striatales DA	-0.12	-0.22	-0.15	0.30	0.19	0.30	-0.25	0.35
Zellen in SN	-0.04	-0.30	0.08	0.15	0.24	-0.08	-0.04	0.20
BALB/c (n=23)								
striatales DA	0.18	0.16	0.34	0.29	0.29	0.13	-0.12	-0.02
Zellen in SN	-0.13	-0.07	0.16	0.03	0.12	0.24	0.07	0.21

Lokomotion = zurückgelegte Strecke; Aufrichtungen = Gesamtdauer aller Aufrichtungen; striatales DA = neostriatale Dopaminkonzentration; Zellen in SN = mittlere Anzahl TH-positiver Zellen pro Schnitt in der Substantia nigra. Die Stichproben setzen sich zusammen aus Männchen und Weibchen. Keine Korrelation erreichte einen p-Wert unter 0.05.

Tabelle A-5. Plus-Maze, Parentalgeneration: Defäkation (Anzahl Boli; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen und Weibchen der Stämme C57BL/6 und BALB/c, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	C57BL/6				**BALB/c**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=12)	**MPTP (n=13)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=11)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=13)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=12)**
Tag 3	1.7 ± 0.5	2.0 ± 0.7	1.3 ± 0.5	2.4 ± 0.7	3.3 ± 1.0	4.6 ± 0.7	1.7 ± 0.6	2.7 ± 0.5
Tag 4	1.3 ± 0.5	2.6 ± 0.7	1.5 ± 0.6	2.0 ± 0.5	4.9 ± 1.0	5.4 ± 0.7	2.3 ± 0.7	3.5 ± 0.8

Tabelle A-6. Offenfeld, F1-Generation: Defäkation (Anzahl Boli; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen und Weibchen der Stämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF1				**BCB6F1**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=10)	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**
Tag 1	4.0 ± 0.8	0.7 ± 0.5	2.1 ± 0.4	0.1 ± 0.1	2.9 ± 0.6	1.0 ± 0.5	1.6 ± 0.5	0.1 ± 0.1
Tag 2	6.4 ± 0.5	6.0 ± 0.9	4.7 ± 0.6	4.2 ± 0.6	3.7 ± 0.5	3.7 ± 0.7	3.0 ± 0.5	3.7 ± 0.6
Tag 3	7.4 ± 1.0	7.7 ± 1.0	5.8 ± 0.9	5.0 ± 0.5	6.5 ± 0.6	5.0 ± 0.8	5.0 ± 0.4	3.4 ± 0.5
Tag 4	6.1 ± 0.4	8.8 ± 1.6	6.1 ± 0.6	5.9 ± 0.8	7.9 ± 1.1	7.0 ± 0.6	5.2 ± 0.9	5.0 ± 0.6

Tabelle A-7. Pole-Test, F1-Generation: relativer Anteil der Tiere, die die Stange während der Beobachtungszeit verlassen haben. Getestet wurden Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF1				**BCB6F1**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=10)	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**
Tag 1	90%	70%	80%	60%	60%	60%	90%	80%
Tag 2	100%	90%	100%	80%	50%	60%	80%	80%
Tag 3	90%	90%	80%	80%	20%	50%	80%	60%
Tag 4	90%	70%	80%	80%	20%	50%	60%	40%

Tabelle A-8. Pole-Test, F1-Generation: Anzahl ganzer Drehungen (Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF1				**BCB6F1**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=10)	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=)**	**MPTP (n=)**
Tag 1	1.4 ± 0.3	2.0 ± 1.0	1.9 ± 0.8	1.0 ± 0.2	2.3 ± 0.8	1.9 ± 0.7	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.3
Tag 2	1.0 ± 0.0	3.1 ± 1.9	1.0 ± 0.0	2.4 ± 1.2	3.7 ± 1.4	2.6 ± 1.0	2.4 ± 1.0	1.8 ± 0.9
Tag 3	2.4 ± 1.4	2.2 ± 1.0	2.9 ± 1.3	2.5 ± 1.5	5.4 ± 1.4	3.9 ± 1.1	4.0 ± 1.6	4.4 ± 1.8
Tag 4	2.3 ± 1.3	6.3 ± 2.0	3.7 ± 1.8	4.0 ± 1.6	6.4 ± 2.0	5.3 ± 1.5	5.3 ± 2.2	7.9 ± 2.2

Tabelle A-9. Körpergewicht, F1-Generation: Dargestellt sind die Daten (in g, Mittelwerte und Standardfehler) für Männchen und Weibchen der Stämme B6BCF1 und BCB6F1, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten. Die Messung an Tag 1 erfolgte unmittelbar vor der ersten Injektion.

	B6BCF1				**BCB6F1**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=10)	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**	**KSL (n=10)**	**MPTP (n=10)**
Tag 1	26.9	26.3	20.0	20.6	25.6	27.2	20.8	20.4
	±0.7	±0.8	±0.3	±0.5	±0.3	±0.6	±0.5	±0.4
Tag 3	26.6	26.1	19.6	20.3	24.6	25.9	19.9	18.9
	±0.7	±0.7	±0.2	±0.4	±0.3	±0.6	±0.3	±0.2
Tag 5	26.9	26.5	19.8	20.5	24.7	26.4	20.3	19.7
	±0.7	±0.6	±0.3	±0.5	±0.3	±0.7	±0.3	±0.3
Tag 7	26.8	26.2	19.9	20.5	24.8	26.4	20.1	19.9
	±0.7	±0.6	±0.2	±0.4	±0.2	±0.6	±0.4	±0.3

Tabelle A-10. Offenfeld, F2-Generation: Defäkation (Anzahl Boli; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen und Weibchen der Stämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF2				**BCB6F2**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=12)	**MPTP (n=84)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=65)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=97)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=69)**
Tag 1	2.7 ± 0.7	0.2 ± 0.1	2.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	1.9 ± 0.4	0.2 ± 0.0	1.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Tag 2	2.8 ± 0.6	3.9 ± 0.3	2.7 ± 0.4	2.8 ± 0.3	3.3 ± 0.4	4.2 ± 0.3	2.9 ± 0.5	3.6 ± 0.3
Tag 3	5.5 ± 0.6	5.0 ± 0.3	4.8 ± 0.6	4.3 ± 0.2	4.6 ± 0.7	4.7 ± 0.3	3.3 ± 0.5	4.1 ± 0.3
Tag 4	6.9 ± 0.9	6.6 ± 0.4	5.7 ± 1.0	5.1 ± 0.4	5.5 ± 0.8	6.4 ± 0.4	6.3 ± 0.9	5.2 ± 0.4

Tabelle A-11. Pole-Test, F2-Generation: relativer Anteil der Tiere, die die Stange während der Beobachtungszeit verlassen haben. Getestet wurden Männchen und Weibchen der Mausstämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	B6BCF2				**BCB6F2**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=12)	**MPTP (n=84)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=65)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=97)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=69)**
Tag 1	75%	48%	67%	58%	75%	60%	92%	74%
Tag 2	67%	75%	50%	71%	67%	77%	75%	75%
Tag 3	83%	85%	50%	72%	58%	76%	67%	77%
Tag 4	75%	82%	50%	69%	58%	78%	50%	77%

Tabelle A-12. Pole-Test, F2-Generation: auf der Stange verbrachte Zeit bis zum vollständigen Betreten des Bodens (in s; Mittelwerte und Standardfehler). Ausgeschlossen wurden von der in Tabelle A-18 vorgestellten Stichprobe alle Tiere, die die Stange an Tag 4 nicht verlassen hatten.

	B6BCF2				**BCB6F2**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=9)	**MPTP (n=69)**	**KSL (n=6)**	**MPTP (n=45)**	**KSL (n=7)**	**MPTP (n=76)**	**KSL (n=6)**	**MPTP (n=53)**
Tag 1	59.9	79.8	59.8	80.9	17.6	69.0	44.2	69.0
	±11.4	±5.4	±16.5	±5.7	±2.1	±5.2	±9.8	±5.0
Tag 2	38.3	48.5	47.3	58.3	16.3	38.5	21.3	41.3
	±11.3	±4.6	±17.7	±5.6	±2.8	±3.8	±4.7	±4.9
Tag 3	26.2	26.1	33.0	33.2	14.4	27.2	21.8	28.2
	±8.2	±2.5	±10.2	±5.4	±0.9	±3.3	±3.0	±4.1
Tag 4	13.6	16.9	15.5	25.4	17.3	21.1	15.3	23.3
	±2.0	±1.2	±2.7	±3.8	±5.7	±2.2	±1.7	±3.3

Tabelle A-13. Körpergewicht, F2-Generation: Dargestellt sind die Daten (in g, Mittelwerte und Standardfehler) für Männchen und Weibchen der Stämme B6BCF2 und BCB6F2, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten. Die Messung an Tag 1 erfolgte unmittelbar vor der ersten Injektion.

	B6BCF2				**BCB6F2**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	KSL (n=12)	**MPTP (n=84)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=65)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=97)**	**KSL (n=12)**	**MPTP (n=69)**
Tag 1	27.1 ±0.7	27.4 ±0.3	21.5 ±0.4	20.8 ±0.2	27.0 ±0.8	27.2 ±0.2	21.2 ±0.6	21.1 ±0.2
Tag 3	26.8 ±0.8	26.5 ±0.3	21.4 ±0.4	19.9 ±0.2	26.5 ±0.9	26.5 ±0.2	20.3 ±0.6	20.1 ±0.2
Tag 5	26.6 ±0.7	26.7 ± 0.3	21.1 ±0.4	20.5 ±0.2	26.7 ±0.8	26.7 ±0.2	20.7 ±0.6	20.8 ±0.2
Tag 7	26.4 ±0.6	26.7 ±0.2	21.3 ±0.4	20.6 ±0.2	26.6 ±0.8	26.6 ±0.2	20.6 ±0.6	20.8 ±0.2

Tabelle A-14. Neostriale DA-Konzentration in pigmentierten und Albino-Tieren, F2-Generation: Dargestellt sind die Daten (in µg/g Hirngewebe; Mittelwerte und Standardfehler) für Männchen und Weibchen der Mausstämmen B6BCF2 und BCB6F2, die eine Behandlung mit Kochsalzlösung erhalten hatten. pig = pigmentiert, alb = albino.

	B6BCF2				**BCB6F2**			
	Männchen		**Weibchen**		**Männchen**		**Weibchen**	
	pig (n=9)	**alb (n=2)**	**pig (n=11)**	**alb (n=1)**	**pig (n=9)**	**alb (n=3)**	**pig (n=10)**	**alb (n=2)**
DA-Konzentration	15.0 ±0.8	15.8 ±0.1	15. ±0.4	14.7	15.7 ±0.	14.2 ±1.2	14.9 ±0.8	14.1 ±0.1

Tabelle A-15. Offenfeld, Tyrosinase-Untersuchung: Defäkation (Anzahl Boli; Mittelwerte und Standardfehler). Getestet wurden Männchen der Stämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	Tyr+		**Tyr-**	
	KSL (n=12)	**MPTP (n=12)**	**KSL (n=11)**	**MPTP (n=12)**
Tag 1	1.4 ± 0.5	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.1 ± 0.1
Tag 2	2.0 ± 0.5	2.1 ± 0.5	1.4 ± 0.6	2.3 ± 0.4
Tag 3	3.9 ± 0.7	4.6 ± 0.7	2.6 ± 0.8	5.7 ± 0.9
Tag 4	4.8 ± 0.4	4.5 ± 0.5	4.1 ± 1.2	5.4 ± 1.2

Tabelle A-16. Pole-Test, Tyrosinase-Untersuchung: relativer Anteil der Tiere, die die Stange während der Beobachtungszeit verlassen haben. Getestet wurden Männchen der Stämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten.

	Tyr+		**Tyr-**	
	KSL (n=12)	**MPTP (n=12)**	**KSL (n=11)**	**MPTP (n=12)**
Tag 1	100%	33%	82%	33%
Tag 2	100%	75%	82%	67%
Tag 3	100%	92%	100%	75%
Tag 4	100%	83%	100%	92%

Tabelle A-17. Körpergewicht, Tyrosinase-Untersuchung: Dargestellt sind die Daten (in g; Mittelwerte und Standardfehler) für Männchen der Stämme Tyr+ und Tyr-, die entweder eine Behandlung mit Kochsalzlösung (KSL) oder MPTP4x15 erhalten hatten. Angaben. Die Messung an Tag 1 erfolgte unmittelbar vor der ersten Injektion.

	Tyr+		**Tyr-**	
	KSL (n=12)	**MPTP (n=12)**	**KSL (n=11)**	**MPTP (n=12)**
Tag 1	24.9 ± 0.4	25.0 ± 0.5	25.2 ± 0.4	25.1 ± 0.7
Tag 3	25.0 ± 0.4	24.2 ± 0.5	25.3 ± 0.3	23.1 ± 0.6
Tag 5	24.5 ± 0.4	24.5 ± 0.6	25.7 ± 0.3	25.0 ± 0.7
Tag 7	24.5 ± 0.4	24.7 ± 0.5	25.9 ± 0.3	25.4 ± 0.7