

**Aus dem Zentrum für Neurologie  
Neurologische Universitätsklinik Tübingen/ Hertie Institut für klinische  
Hirnforschung  
Abteilung Allgemeine Neurologie  
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. A. Melms**

**Modulation des motorischen Lernens durch lokale Dauerapplika-  
tion des Dopaminvorläufers Levodopa und der Dopaminrezeptor-Agonisten SKF 38393 und Quinpirol in den motorischen Kor-  
tex Area M1 – eine tierexperimentelle Studie am Rattenmodell**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Stephanie Frida Sophie Heim**

**aus  
Aalen**

**2010**

Dekan: Professor Dr. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Luft

2. Berichterstatter: Professor Dr. N. Birbaumer

*Für meine Familie und meine Freunde.*

*Ihnen fehlte es nie am Eifer, mir Mut zuzusprechen.*



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Grundlagen des motorischen Lernens .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Lern- und Erinnerungsphasen.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Rolle verschiedener Transmittersysteme .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Rezeptorfamilien .....</b>	<b>6</b>
1.4.1 D <sub>1</sub> -Rezeptorfamilie .....	7
1.4.2 D <sub>2</sub> -Rezeptorfamilie .....	7
1.4.3 Calciumregulierter Transduktionsmechanismus.....	8
<b>1.5 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>10</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Untersuchungsmaterial.....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Tiere.....	11
<b>2.2 Untersuchungsmethoden.....</b>	<b>12</b>
2.2.1 Greiftraining.....	12
2.2.1.1 <i>Geräte</i> .....	12
2.2.1.2 <i>Lernphasen beim Greifvorgang</i> .....	14
2.2.2 Operative Implantation der Kanüle und der osmotischen Pumpe .....	17
2.2.2.1 <i>Pumpenpräparation</i> .....	17
2.2.2.2 <i>Operationsverfahren</i> .....	21
2.2.2.3 <i>Tötungsmethode: Perfusion</i> .....	23
2.2.3 Aufarbeitung der Gehirne .....	23

---

2.2.3.1	<i>Anfertigung der Hirnschnitte</i> .....	23
2.2.3.2	<i>Histologische Färbung nach Nissl</i> .....	24
2.3	<b>Statistische Verfahren</b> .....	25
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>27</b>
3.1	<b>Einflüsse von Dopamin und seiner selektiven Rezeptoragonisten auf das motorische Lernen</b> .....	<b>27</b>
3.1.1	Einflüsse auf die Anzahl der erfolgreichen Greifversuche .....	27
3.1.2	Einflüsse auf die Latenzzeiten .....	29
3.1.2.1	Latenzzeiten $T_{\text{door-pellet}}$ .....	29
3.1.2.2	Latenzzeiten $T_{\text{pellet-door}}$ .....	33
3.2	<b>Ausschluss systematischer Fehler (Bias)</b> .....	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>38</b>
4.1	<b>Methodische Aspekte</b> .....	<b>38</b>
4.1.1	Besonderheiten des Dopamins .....	38
4.1.2	Das Rattenmodell .....	44
4.2	<b>Hypothesendiskussion</b> .....	<b>47</b>
4.3	<b>Ausblick</b> .....	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>54</b>
6.1	<b>Erklärung zur Tierhaltung</b> .....	<b>54</b>
6.2	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>54</b>
6.3	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>56</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>62</b>
	<b>LEBENS LAUF VON STEPHANIE FRIDA SOPHIE HEIM</b> .....	<b>63</b>

## 1 EINLEITUNG

Das menschliche Gehirn kann ein Leben lang lernen. Sogar nach Zerstörung wichtiger Hirnregionen ist ein Wiedererlangen von motorischen Fähigkeiten möglich. In einer alternden Gesellschaft wie der unseren hat dieses ungeheure und noch wenig verstandene Potential zur neuronalen Reorganisation, auch neuronale Plastizität genannt, große Relevanz. Dass Plastizität am motorischen Lernen beteiligt ist, konnte erstmalig am Lernmodell der Ratte gezeigt werden (Rioul-Pedotti et al., 1998).

### 1.1 GRUNDLAGEN DES MOTORISCHEN LERNENS

An der Initiierung und Kontrolle einer Bewegung sind viele motorische Systeme beteiligt. Der motorische Kortex spielt dabei als exekutive Instanz eine zentrale Rolle (s. Abb. 1.1).

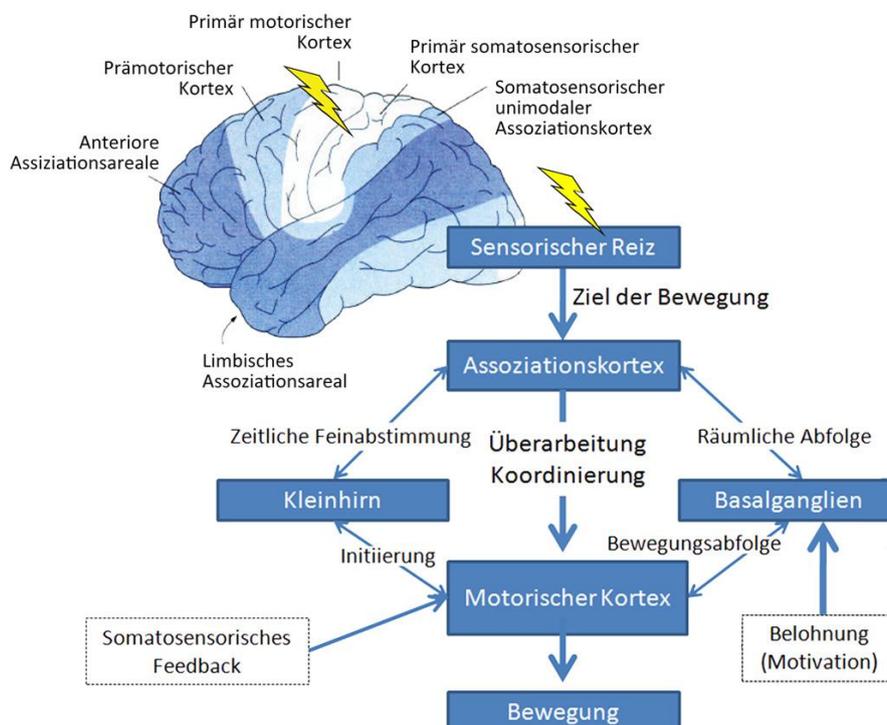


Abbildung 1.1: Modell der motorische Kontrolle (modifiziert nach Hikosaka et al., 1999)

Ausgangspunkt der Bewegung ist eine veränderte Umgebungsbedingung, die als sensorischer Reiz wahrgenommen wird. Daraufhin wird ein Bewegungskonzept auf ein bestimmtes Ziel hin entworfen und dem Assoziationskortex übermittelt. Nach Rückkopplungsschleifen mit verschiedenen Gehirnteilen, wie dem Kleinhirn (zuständig für die zeitliche Feinabstimmung und Bewegungsinitiation) und den Basalganglien (entwerfen die räumliche Bewegungsabfolge, beeinflussen die Bewegungsinitiation je nach Rückmeldung vom Belohnungssystem), wird der motorische Kortex über den Bewegungsentwurf informiert. Nach dem Abgleich des Bewegungsentwurfs durch ein somatosensorisches Feedback über die aktuelle Lage des Körpers im Raum wird der primär motorische Kortex dann Ausgangspunkt für die Aktivierung von Nervenbahnen, die selektiv diejenigen Muskelgruppen ansteuern, die die gewünschte Bewegung ausführen sollen.

Neue Forschungsansätze lassen vermuten, dass der motorische Kortex über diese Funktion hinaus auch direkt am Erlernen und Erinnern von Bewegungsabläufen beteiligt ist. Die primär motorische Hirnrinde (M1) der Ratte zeigt beim Erlernen einer motorischen Handlungsabfolge auf makro- wie mikrostruktureller Ebene eine Aktivierung und Umstrukturierung, die eine aktive Beteiligung dieses Areals am Lern- und Erinnerungsprozess sehr nahelegt (Rioult-Pedotti et al., 1998; Sanes und Donoghue, 2000; Luft et al., 2004; Harms et al., 2008; Molina-Luna et al., 2009). Will man diesen Prozess nun näher studieren, kann man dies auf ganz verschiedenen Ebenen tun: auf der Verhaltensebene, in der Analyse der Aktivierung einzelner Hirnareale, auf der Ebene der neuronalen Netzwerke, auf der Ebene der einzelnen Nervenzellen, der Proteine und Gene (Buitrago, 2005). Grundgedanke der vorliegenden Dissertation ist es, durch selektives Ansteuern von Nervenzellrezeptoren ein für das Lernen relevantes neuronales Netzwerk zu beeinflussen und den Effekt auf der Verhaltensebene zu beobachten. In der vorliegenden Arbeit haben wir uns auf das dopaminerge Transmittersystem konzentriert. Dopamin ist der zentrale Signalüberträgerstoff für das belohnungsassoziierte Lernen im ZNS (Hyman et al., 2006). Je unerwarteter dabei die Belohnung, desto mehr unterstützt Dopamin das Lernen (Schultz, 1998, 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass die Modifikation der dopaminergen Hintergrundaktivität durch Medikamente Lernen bei Schizophrenie-, Parkinson- und Schlaganfallpatienten verbessern kann (Daniel et al., 1991; Lange et al., 1992; Scheidtmann et al., 2001; Floel et al., 2005). In der prä-

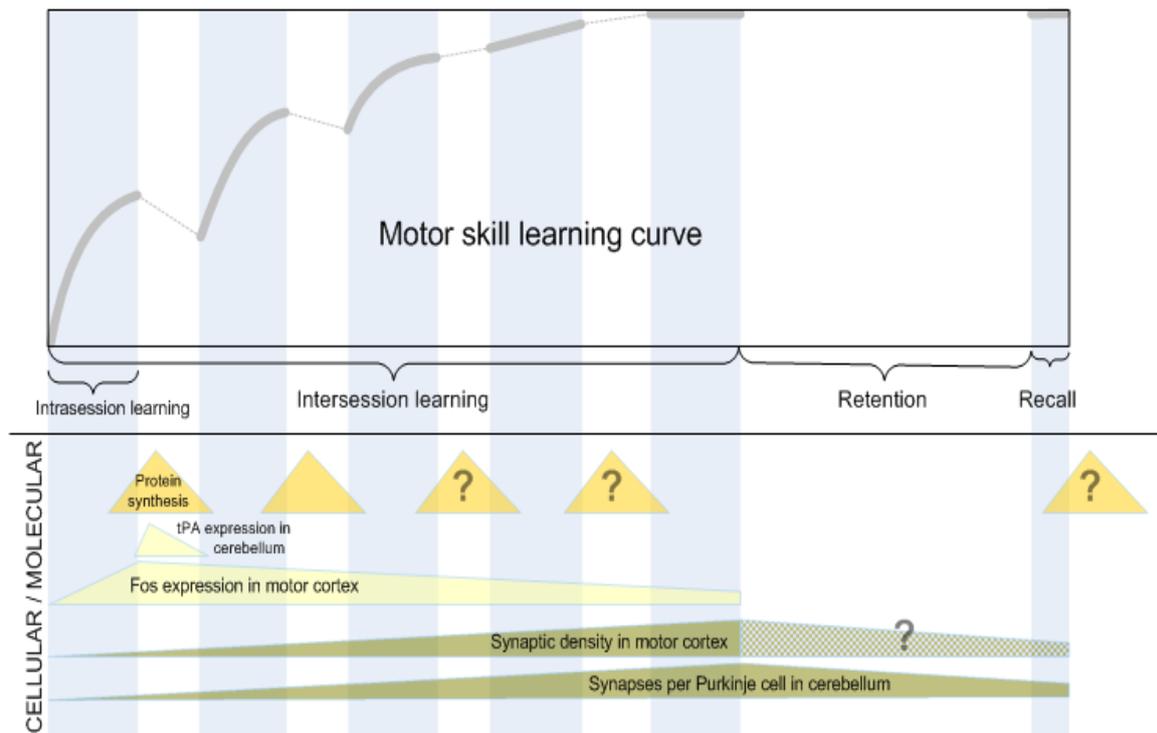
---

frontalen Hirnrinde wurde bereits nachgewiesen, dass Dopamin für die motorische Funktion eine wichtige Rolle spielt (Del Arco und Mora, 2008; Heijtz et al., 2007). Dopamin ist zudem an Prozessen der neuronalen Plastizität beteiligt (Hosp et al., 2009; Molina-Luna et al., 2009). Experimente zur Proteinsynthese in M1 ergaben, dass während des Lernvorgangs verschiedene Gene, unter ihnen das für den Dopamin-2-Rezeptor, vermehrt transkribiert werden (Buitrago, 2005). Es existieren dopaminerge Projektionen in M1, über deren Funktion noch wenig bekannt ist (Williams und Goldman-Rakic, 1993; Molina-Luna et al., 2009). Doch all diese Daten lassen vermuten, dass Dopamin in M1 für das motorische Lernen eine wichtige Rolle spielt. Es liegt nahe, diese Hypothese genauer zu untersuchen.

## 1.2 LERN- UND ERINNERUNGSPHASEN

Wir wissen heute, dass die Prozesse von Lernen und Erinnern in verschiedene Phasen gegliedert werden können. Auf die initiale Akquisitionsphase folgen die Phasen der Gedächtnisbildung und des Wiedererinnerns. Was allerdings genau in den einzelnen Phasen auf hirnergänzlicher Ebene geschieht, ist noch Spekulation.

Die Akquisitionsphase ist die eigentliche Lernphase, bei der in kurzer Zeit ein starker Zuwachs an motorischer Fertigkeit erfolgt. Eine Theorie besagt, dass in dieser Phase verschiedene Prozesse, die eine neue Bewegung unterschiedlich schnell lernen lassen, ineinander greifen. Auf ein schnelles Lernen innerhalb einer Trainingssitzung folgt ein langsames Lernen zwischen den Trainingseinheiten. Evidenz für diese Prozesse mit unterschiedlicher Dynamik existiert auf verschiedenen experimentellen Ebenen (Luft und Buitrago, 2005). Wichtig dabei ist, dass nicht nur während der Trainingsphasen (Intrasession learning), sondern auch in den Trainingspausen Lernen stattfindet (Inter-session learning), was daran zu erkennen ist, dass der Lernfortschritt über die Pause hinweg erhalten bleibt und das Ausgangsniveau des nächsten Trainings gegenüber dem vorherigen höher liegt (s. Abb. 1.2).



**Abbildung 1.2: Lernkurve beim Erlernen einer neuen Bewegungsabfolge (Motor skill learning curve; modifiziert nach Luft und Buitrago, 2005)**

Die Kurve beginnt mit einem steilen Lernzuwachs während des Trainings (Intrasection learning, blaue Felder). In den Trainingspausen bleibt das Endniveau des letzten Trainings erhalten (Intersession learning, weiße Felder). Auf die ansteigende Akquisitionsphase folgt die Plateauphase (retention), in der die motorische Leistung ihr Maximum erreicht hat, Erlerntes wird abgespeichert. Die letzte Phase ist die Erinnerungsphase (recall), in der auf Erlerntes zurückgegriffen werden kann. Die Lern- und Erinnerungsphasen spiegeln sich in zellulären und molekulare Mechanismen wider: Proteinsynthese (gelbe Dreiecke) findet vor allem in den Pausen der ersten Trainingseinheiten statt, die Genexpression (c-Fos, gelber Balken) steigt in der ganz frühen Akquisitionsphase an, die Dichte von Synapsen im motorischen Kortex (oberer grüner Balken) und im Kleinhirn (unterer grüner Balken) steigt bis zum Beginn der Plateauphase an.

Auf die Akquisitionsphase folgt die Phase der Gedächtnisbildung (retention). Das Performancemaximum ist erreicht, Erlerntes wird abgespeichert. Die letzte Phase ist die der Erinnerung, ein erlerntes Bewegungsprogramm kann bei Bedarf abgerufen werden (recall). Die drei verschiedenen Lern- und Erinnerungsphasen finden ihr Korrelat nicht nur auf der Verhaltensebene, sondern auch auf molekularer und zellulärer Ebene (z. B.:

vermehrte Proteinsynthese während des Inter-session learning der Akquisitionsphase) und in der phasenspezifischen Aktivierung verschiedener Hirnareale und Transmittersysteme (Luft et al., 2004).

### 1.3 ROLLE VERSCHIEDENER TRANSMITTERSYSTEME

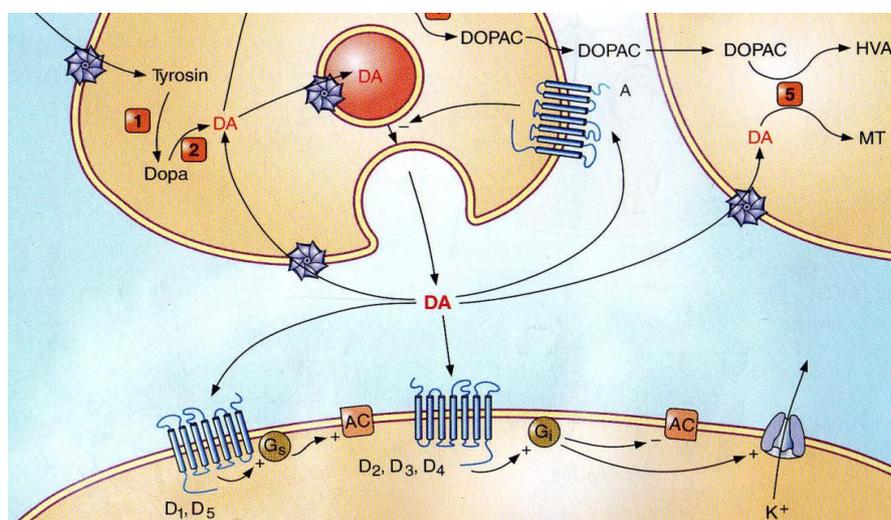
Die beschriebenen Veränderungen während der Lernphasen kann man auch unter dem Begriff der neuronalen Plastizität zusammenfassen. Sie bezeichnet die Fähigkeit des Gehirns, sich an veränderte Umgebungsbedingungen im Rahmen eines Lernprozesses anzupassen. Ihr morphologisches Korrelat sind molekulare Veränderungen, synaptische Modifizierungen, Veränderungen auf zellulärer Ebene, und Veränderungen in der Transmitterfreisetzung in verschiedenen Hirnregionen.

Durch Zerstörung des cholinergen Transmittersystems der basalen, präfrontalen Hirnrinde (Nucleus basalis magnocellularis) der Ratte konnte erstmalig gezeigt werden, dass dieses Transmittersystem am Lernprozess beteiligt ist (Conner et al., 2003). Das dopaminerge System scheint ebenso wie das cholinerge für den Lernprozess und die Gedächtnisausbildung im präfrontalen Kortex wichtig zu sein (Hyman et al., 2006; Nagai et al. 2007). Neben dem präfrontalen Kortex besitzt auch die primär motorische Hirnrinde des Menschen und der Ratte dopaminerge Projektionen (Williams und Goldman-Rakic, 1993; Molina-Luna et al., 2009). Das Wissen um die Rolle dieses Transmittersystems in M1 ist allerdings begrenzt. Es liegt nahe, Parallelen zwischen den beiden Hirnarealen zu ziehen und auch dem dopaminergen System im motorischen Kortex eine Rolle beim Lernen zuzusprechen. Und in der Tat ist das Erlernen einer neuen Bewegungsabfolge erschwert, wenn man Dopaminrezeptoren im motorischen Kortex durch Dopaminrezeptor-Antagonisten blockiert. Zerstört man die dopaminergen Nervenzellen, die in den motorischen Kortex projizieren, dann lernen diese Ratten signifikant schlechter als Kontrolltiere. Sobald man aber das durch die Läsion verursachte dopaminerge Defizit durch lokale Applikation des Dopaminvorläufers Levodopa ausgleicht, können diese Ratten wieder bis zu einem gewissen Grad lernen.

Durch die lokale Applikation von Dopaminrezeptor-Antagonisten verändert sich auch die Erregbarkeit des motorischen Kortex in M1 und der Mechanismus der Langzeitpotenzierung (LTP) wird beeinflusst. Antagonisiert man den Dopamineffekt erst in der Plateauphase, dann zeigt sich keine Veränderung in der motorischen Leistung der Tiere (Molina-Luna et al., 2008). Diese Daten lassen darauf schließen, dass Dopamin in der Akquisitionsphase einer neuen Bewegungsabfolge eine wichtige Rolle spielt, wohingegen das dopaminerge System in M1 für die Ausführung der Bewegung weniger wichtig ist.

#### 1.4 REZEPTORFAMILIEN

Nach heutigem Wissensstand gibt es fünf verschiedene Dopaminrezeptoren,  $D_1$  bis  $D_5$ . Die zuerst beschriebenen  $D_1$ - und  $D_2$ -Rezeptoren sind weitaus häufiger als die übrigen drei Subtypen. Alle fünf sind G-Protein gekoppelt. Nach ihrer DNA-Sequenz werden die Rezeptoren in zwei Untergruppen gegliedert. Dieser Einteilung entsprechen auch die zwei verschiedenen Signaltransduktionswege, über welche die Rezeptoren an der Zielzelle wirken (Civelli et al., 1993; Gingrich und Caron, 1993; Pollak, 2004) (s. Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3: Synaptische Übertragung durch Dopamin (nach Aktories et al., 2005)**

Die abgebildete postsynaptische Zelle besitzt  $D_1$ -,  $D_2$ -,  $D_3$ -,  $D_4$ - und  $D_5$ -Rezeptoren, Pfeile zeigen die Stoffbewegung. Durch Dopamin (DA) stimulierte  $D_1$ - und  $D_5$ -Rezeptoren aktivieren über  $G_s$ -Proteine (stimulierend) die Adenylatcyclase (+), stimulierte  $D_2$ -,  $D_3$ - und  $D_4$ -Rezeptoren

---

hemmen über  $G_i$ -Proteine (inhibierend) die Adenylatcyclase (-) oder öffnen  $K^+$ -Kanäle (+). Die DA-Wirkung wird durch Wiederaufnahme in die präsynaptische Zelle oder in benachbarte Gliazellen beendet. Die DA-Ausschüttung kann zusätzlich durch einen präsynaptischen Autorezeptor (A) reguliert werden.

Überdies gibt es Grund zu der Annahme, dass ein weiterer dopamingekoppelter Transduktionsweg existiert, der zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führt (Pollak, 2004; Rashid et al., 2007<sub>a</sub>; Rashid et al., 2007<sub>b</sub>; Pekanovic et al., in Vorbereitung). Dopamin selbst besitzt zu den einzelnen Rezeptoren eine unterschiedlich starke Affinität, dabei ist die Affinität zur  $D_{2/3/4}$ -Gruppe größer als zur  $D_{1/5}$ -Gruppe (Gingrich und Caron, 1993; Aktories et al., 2005).

---

#### 1.4.1 $D_1$ -REZEPTORFAMILIE

Die  $D_{1/5}$ -Rezeptorfamilie vermittelt ihren Effekt über die stimulierenden  $G_s$ -Proteine, welche die Adenylatcyclase (AC) aktivieren (Kebabian und Calne, 1979; s. Abb. 1.3). Dieses Enzym wird zur vermehrten Bildung von cAMP angeregt, welches schließlich den Dopamineffekt intrazellulär übermittelt.  $D_1$ -Rezeptoren befinden sich im motorischen Kortex von Primat und Ratte, in oberflächlichen (I, II und III a) und tiefen Schichten (V und VI) (Lidow et al., 1991; Dawson et al., 1986).

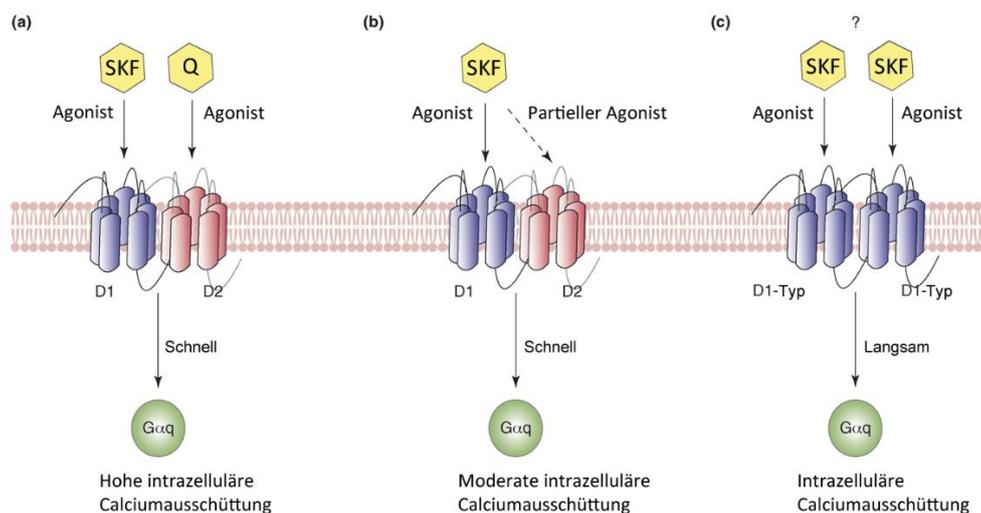
---

#### 1.4.2 $D_2$ -REZEPTORFAMILIE

Die  $D_{2/3/4}$ -Rezeptorfamilie hemmt stattdessen bei Aktivierung über inhibitorische  $G_i$ -Proteine die Adenylatcyclase (AC) und der cAMP-Spiegel sinkt (Onali et al., 1984). Damit ist der  $D_2$ -Effekt an der Zielzelle dem  $D_1$ -Effekt entgegengesetzt. Der  $D_2$ -Rezeptor ist nicht nur an der Postsynapse lokalisiert, sondern kann auch als hemmender Autorezeptor (A) an der Präsynapse die Dopaminausschüttung regulieren (Floresco und Magyar, 2006) (s. Abb. 1.3).  $D_2$ -Rezeptoren befinden sich vor allem in den tiefen Schichten des motorischen Kortex (Schicht V), allerdings in einer zehnmal geringeren Dichte als  $D_1$ -Rezeptoren (Bouthenet et al., 1987; Lidow et al., 1991; Martres et al., 1985; Ariano et al., 1993).

## 1.4.3 CALCIUMREGULIERTER TRANSDUKTIONSMECHANISMUS

Erste Evidenz deutet darauf hin, dass ein weiterer, dritter Signaltransduktionsweg existiert, bei dem ein dopamingetriggertes Calciumsignal die zentrale Rolle spielt. Dieser Rezeptor ist an  $G_{q/11}$ -Proteine gekoppelt, welche das Enzym Phospholipase C $\beta$  aktivieren, das über Inositoltrisphosphat die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht. Es gibt guten Grund zur Annahme, dass im Gehirn ein solcher Dopaminrezeptor existiert (Lee et al., 2004; Pekanovic et al., in Vorbereitung). Welche Struktur dieser Rezeptor haben könnte, wird derzeit kontrovers diskutiert (Rashid et al., 2007<sub>b</sub>) (s. Abb. 1.4).



**Abbildung 1.4: Mögliche Formen von  $G_{q/11}$ -gekoppelten Dopaminrezeptoren (modifiziert nach Rashid et al., 2007<sub>b</sub>)**

(a) Aktivierung des heterooligomeren  $D_1$ - $D_2$ -Korezeptors nach gleichzeitiger Applikation eines  $D_1$ - und  $D_2$ -Agonisten (SKF und Q) führt zu einer schnellen Signalübertragung über  $G_q$ -Proteine mit konsekutiver Calciumausschüttung aus intrazellulären Speichern. (b) Aktivierung des  $D_1$ - $D_2$ -Korezeptors durch einen  $D_1$ -Agonisten (SKF) mit partieller  $D_2$ -Agonistenwirkung. (c)  $G_{q/11}$ -gekoppelter  $D_1$ -Rezeptor, der zu einem langsamen Calciumanstieg führt. Alle Rezeptoren sind vereinfacht als Dimere dargestellt.

Ein Agonist, der selektiv den  $D_1$ -Rezeptortyp stimuliert, ist offenbar in der Lage, die intrazelluläre Calciumkonzentration langsam zu erhöhen, ohne die Aktivität der Adenylatcyclase zu beeinflussen (Undie et al., 1994). Allerdings konnte dieser vermut-

lich  $G_{q/11}$ -gekoppelte  $D_1$ -Typ, der sich vom  $G_s$ -gekoppelten  $D_1$ -Typ unterscheiden muss, auf zellulärer Ebene nicht nachgewiesen werden (Rashid et al., 2007<sub>a</sub>). Eine andere Hypothese geht von der Existenz eines  $D_1$ - $D_2$ -Korezeptors aus, der durch die Bildung eines Heterodimers aus den beiden Einzelrezeptoren entsteht und an  $G_{q/11}$ -Proteine koppelt. Um diesen Signalweg zu aktivieren, müssen Zellen, die den Korezeptor in ihrer Membran tragen, mit gleichen Mengen an selektiven  $D_1$ - und  $D_2$ -Rezeptoragonisten behandelt werden (Lee et al., 2004). Andere Experimente zeigen, dass auch ein spezieller  $D_1$ -Rezeptoragonist (SKF 83959) allein den Korezeptor aktivieren kann, wenn er eine partielle Agonistenwirkung am  $D_2$ -Rezeptor hat. Es scheint selektive  $D_1$ -Agonisten zu geben, die ihre Wirkung ausschließlich über  $G_{q/11}$ -Proteine vermitteln, andere aktivieren zusätzlich die Adenylatcyclase und schließlich gibt es  $D_1$ -Rezeptoragonisten, die nur  $G_s$ -Proteine stimulieren können (Rashid et al., 2007<sub>b</sub>).

*In vivo* existieren Pyramidenzellen, die beide Rezeptoren zugleich exprimieren. Dies konnte im präfrontalen Kortex und in M1 (Schichten V und VI) der Ratte und im Striatum von Mensch und Ratte gezeigt werden (Vincent et al., 1995; Awenowicz und Porter, 2002; Lee et al., 2004). Eventuell ist die Expression des Korezeptors altersabhängig (Rashid et al., 2007<sub>a</sub>).

Die isolierte Blockade von  $D_1$ - oder  $D_2$ -Rezeptoren ruft ein ähnliches Lerndefizit hervor, wie es durch die Zerstörung dopaminerger Nervenendigungen in M1 hervorgerufen wird. Nach Dopamin-Substitution ist das Defizit reversibel (Molina-Luna et al., 2008). Setzt man nur die Existenz der beiden bekannten Signaltransduktionswege voraus, die durch Aktivierung bzw. Inhibition der Adenylatcyclase das Dopaminsignal übermitteln, wäre ein gegensätzlicher Effekt der  $D_1$ - und  $D_2$ -Rezeptor-Blockade zu erwarten. Der zu beobachtende gleichgerichtete Effekt dagegen ist bemerkenswert. Diese Tatsache legt die Existenz eines weiteren Signaltransduktionsweges nahe, auf welchem beide aktivierten Dopaminrezeptoren eine gemeinsame Signalkaskade ansteuern. Dieser Signaltransduktionsmechanismus könnte für das motorische Lernen von zentraler Bedeutung sein. Das legen Verhaltensexperimente nahe, bei denen man ein erschwertes Lernen nach Blockade des Enzyms Phospholipase C beobachtet hat. Gleich den Dopa-

---

minrezeptor-Antagonisten flacht der Phospholipase-C-Antagonist die Lernkurve ab. Ist das Lernplateau allerdings erreicht, beeinflusst die Hemmung dieses Enzyms den Lernkurvenverlauf nicht mehr. Gibt man Tieren, die mit einem Dopamin-Antagonisten behandelt wurden, einen Phospholipase C-Agonisten, ist das Lerndefizit reversibel. Blockiert man hingegen das Enzym Proteinkinase A, das bei der Bindung von Dopamin an den D<sub>1</sub>-Rezeptor aktiviert wird, verändert sich der Lernkurvenverlauf nicht (Pekanovic et al., in Vorbereitung). Letztgenannter Signaltransduktionsweg scheint damit für das motorische Lernen von untergeordneter Bedeutung zu sein.

## 1.5 ZIELE DER ARBEIT

Unsere Hypothese lautet, dass die lokale Dauerapplikation des direkten Dopaminvorläufers Levodopa das Lernen beim gesunden Tier verbessert. Würde der Dopamineffekt in M1 auf den heteromeren D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>-Korezeptor zurückgehen, wär der Effekt bei alleiniger Gabe der selektiven Dopaminagonisten nicht zu erwarten. Mit der Ko-Applikation beider Agonisten hingegen sollte der Dopamineffekt auf das Lernen replizierbar sein. Ziel der Arbeit ist es, diese Hypothese zu bestätigen oder zu widerlegen.

Bei teilweise widersprüchlichen Ergebnissen über den Dopamineffekt auf zellulärer Ebene (Seamans et al., 2001) könnten aus einem derartigen *in vivo* Experiment wertvolle Erkenntnisse über die Dopaminwirkung an verschiedenen Rezeptoren in den verschiedenen Lernphasen gewonnen werden. Die Versuchstiere sollen zu diesem Zweck randomisiert fünf Gruppen zugeteilt werden, die entweder den D<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten SKF 38393, den D<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten Quinpirol, den Dopaminvorläufer Levodopa, Kochsalz oder äquimolare Mengen beider Agonisten lokal in den primärmotorischen Kortex appliziert bekommen. Um eine kontinuierliche Infusion der Lösungen über alle Lernphasen hinweg zu ermöglichen und die Ratten in ihrem physiologischen Verhalten nicht zu beeinträchtigen, wird ihnen eine osmotische Pumpe mit Infusionssystem implantiert. Die Lernkurven der einzelnen Gruppen sollen nach dem Erreichen der Lernplateauphase nach ihrem Verlauf auf Gruppenunterschiede hin analysiert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 UNTERSUCHUNGSMATERIAL

#### 2.1.1 TIERE

Alle Versuche wurden unter dem Aktenzeichen N 3/05 vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

Die Experimente wurden an 54 männlichen Long Evans Ratten aus eigener Zucht (Herzie Institut für Klinische Hirnforschung, Tübingen), mit einem Gewicht zwischen 210 und 280 g durchgeführt. Am OP-Tag lag das mittlere Alter der Tiere bei 69,4 Tagen (SD  $\pm$  6,1 d).

Im Vortraining (Priming) wurden die Versuchstiere in gemeinsamer Stallung gehalten, 2 bis 5 Ratten pro Käfig (Makrolonkäfig Typ IV, 1800 cm<sup>2</sup> Bodenfläche). Nach dem ersten Trainingstag wurden die Tiere in Einzelkäfige gesetzt (Makrolonkäfig Typ IV, 1800 cm<sup>2</sup> Bodenfläche). Die Futtergabe erfolgte restriktiv mit dem Ziel, die Trainingsmotivation hoch und das Gewicht möglichst konstant zu halten. Alle 24 Stunden, unmittelbar nach dem Training, erhielten die Tiere ihr Futter (Futterpellet; Fa. Cliba Nafag). Während der ganzen Zeit hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser. Die Raumtemperatur in der Tierhaltung lag zwischen 20 und 22 °C, die Luftfeuchtigkeit betrug 55 bis 60 %, eine tägliche Lichtperiode von 2.00 bis 14.00 Uhr und eine sich anschließende Nachtphase wurden konstant beibehalten. Das Training fand immer zur gleichen Tageszeit statt, um eventuelle Unterschiede in den Aktivitätsphasen der Tiere auszuschließen.

## 2.2 UNTERSUCHUNGSMETHODEN

### 2.2.1 GREIFTRAINING

#### 2.2.1.1 GERÄTE

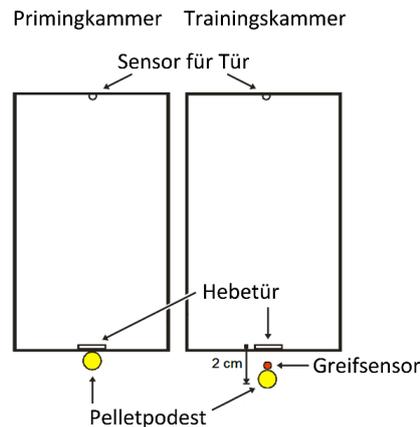
Für das Greiftraining wurde ein Plexiglaskasten (30 x 43 x 40 cm) konstruiert, der durch eine blickdichte Zwischenwand in zwei gleich große Kammern (15 x 43 x 40 cm) unterteilt war, eine Kammer für die Vor-Trainingsphase und eine zweite für alle darauf folgenden Trainingsschritte (s. Abb. 2.1).



**Abbildung 2.1: Plexiglaskasten mit Priming- und Trainingskammer, Außenansicht**

Das Tier wurde in die Kammer gesetzt und diese mit einem Plexiglasdeckel verschlossen, um die Ratte von Störgeräuschen abzuschotten. Den Boden der Kammer bildeten metallene Gitterstäbe. An den Rückwänden beider Kammern befanden sich Berührungssensoren, die für die Tiere mit der Nasenspitze gut erreichbar waren. Die Vorderwände der Kammern besaßen je eine mobile Plexiglasplatte, die einen vertikalen Spalt – ein 1 x 5 cm großes Fenster – verschloss. Die Platten hatten die Funktion von Hebetüren. Durch Betätigung des Sensors an der Rückwand der Kammer konnte das Tier einen Mechanismus auslösen, der zum Hochziehen der Hebetür führte und so das Fenster öffnete. Vor dem Fenster war jeweils ein Pelletpodest platziert. Auch die Podeste waren mit Sensoren ausgestattet. Wurde das Futterpellet (Dustless Precision

Pellets®, 45 mg; Fa. Bioserv) entfernt, das auf dem Sensor des Podestes lag, löste dies einen weiteren Mechanismus aus, der innerhalb von Sekunden zum Verschluss des Fensters durch die Hebetür führte. Die Podeste waren sowohl unterschiedlich angebracht als auch ausgerüstet und unterschieden die Kammern voneinander (s. Abb. 2.2).



**Abbildung 2.2: Primingkammer und Trainingskammer, Blick von oben**

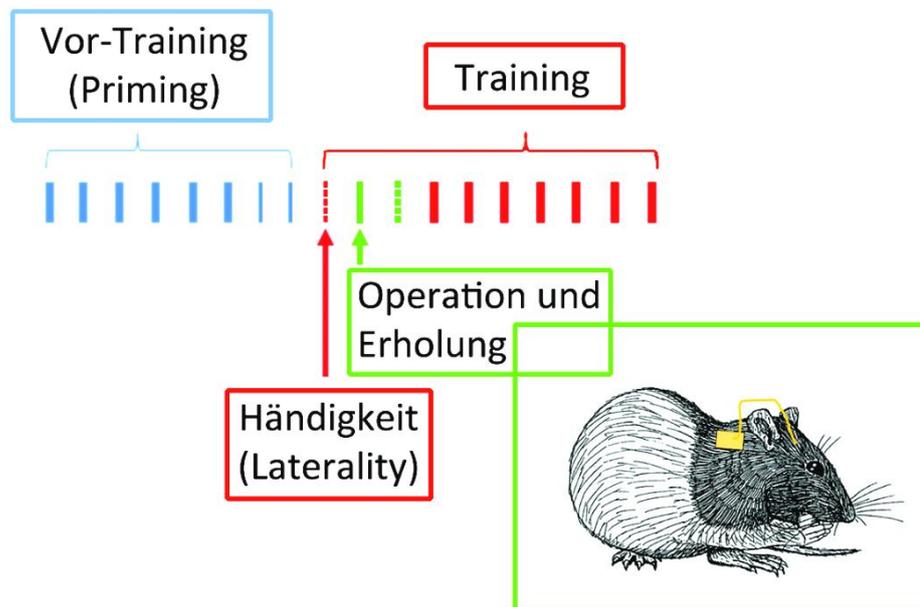
Die Pelletpodeste sind vor den Fenstern, außerhalb der Kammern angebracht. Die Fenster können durch die Hebetüren verschlossen werden. In der Primingkammer (links) kann das Futter mit der Zunge erreicht werden, in der Trainingskammer (rechts) muss das Tier seinen Vorderlauf benutzen (Abstand Fenster-Podest: 2 cm). In der rechten Trainingskammer werden die Greifversuche mit einem Greifsensor erfasst.

Während des Primings war das Pelletpodest unmittelbar vor dem Fenster angebracht und das Tier konnte das Futterpellet mit der Zunge vom Podest ziehen. Während des Trainings wurde das Podest in einem Abstand von 2 cm zum Fenster angebracht. Das Pellet konnte nur durch das Herausstrecken der Vorderpfote vom Podest entfernt werden. Dieses Podest besaß außerdem noch einen extra Greifsensor zwischen Fenster und Podest, welcher die Greifversuche des Tieres beim Training erfasste.

Ein zentrales Steuerelement (Cagemaster) zwischen PC und Kammer empfing alle Sensorsignale und koordinierte die Mechanik. Die Informationen wurden vom Cagemaster an den PC übermittelt, mit dem Programm Lab View® (Version 8.0.1; Fa. National Instruments) verarbeitet und zur späteren Auswertung abgespeichert.

### 2.2.1.2 LERNPHASEN BEIM GREIFVORGANG

Die Tiere wurden zuerst geprimt (s. Abb. 2.3).



**Abbildung 2.3: Abfolge der Primings- und Trainingsphasen (Striche stehen für Tage)**

Nach 6-8 Tagen Priming erfolgte die Bestimmung der Händigkeit. Dieser Tag war zugleich der erste Trainingstag und der Tag zur Bestimmung des Ausgangsniveaus der Performance des Tieres (Baseline). Am darauf folgenden Tag wurden dem Tier die osmotische Pumpe und die Kanüle implantiert. Von diesem Zeitpunkt an wurden der Dopamin-Vorläufer Levodopa, die selektiven Dopamin-Agonisten oder physiologische Kochsalzlösung über die Pumpe in den Motokortex lokal instilliert. Auf eine Erholungsphase von 48 Stunden folgte das postoperative Training über weitere 7 Tage.

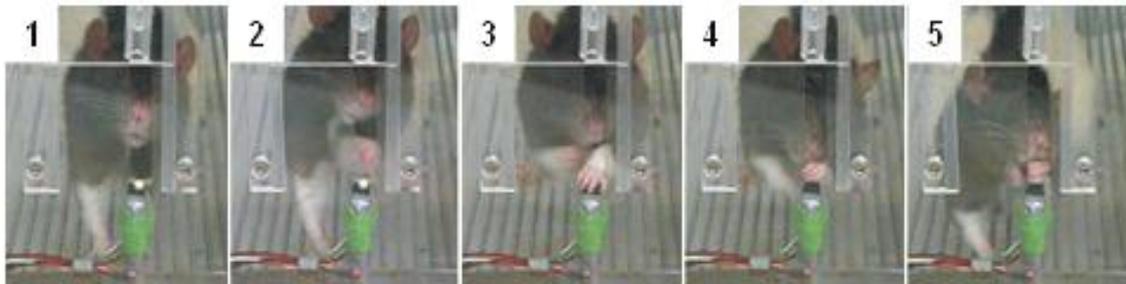
Beim Priming erlernten die Ratten die Grundvoraussetzungen für den Trainingsablauf. Die Tiere sollten sich an die Kammerumgebung gewöhnen (60 min, erster Primingtag), dann im Verlauf lernen, den Sensor an der Rückwand der Kammer mit der Nase zu betätigen, das Futterpellet durch die dann offene Hebetür mit der Zunge zu erreichen und zur Schnauze zu führen. Die Zeit, die die jeweilige Ratte zum Erlernen dieser Handlungsabfolge durch tägliches Üben (30 min, ab dem zweiten Primingtag) benötigte, betrug zwischen 6 und 8 Tagen. Der Handlungsablauf beim Priming beanspruchte die Konzentration des Tieres und erforderte räumliches Lernen (Sensorlokalisation an der

Kammerhinterwand, Lokalisation des Pellets auf dem Podest). Überdies musste ein bestimmtes Konzept (Sensorbetätigung führt zur Türöffnung, diese erlaubt dann den Zugang zum Futter) erlernt werden. Motorisches Lernen fand in der Primingphase nicht statt. Das Priming war damit für die Versuchsauswertung irrelevant. Es galt als abgeschlossen, wenn das Tier an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in einer Zeit von unter 30 min 100 Einzelversuche unternahm. Ein Einzelversuch (Trial) bezeichnet die Zeitspanne von einem Türverschluss zum nächsten.

An die Primingphase schloss sich mit der Bestimmung der Händigkeit des Tieres (Laterality) der erste von acht Trainingstagen an (s. Abb. 2.3). Jetzt wurde das Tier in die Trainingskammer gesetzt und musste erlernen, das Pellet mit der Vorderpfote zu greifen. Nach 25 Trials war der erste Tag beendet. In diesen 25 Greifversuchen sollte das Tier entweder die rechte oder die linke Pfote bevorzugt zum Greifen nutzen. Der Versuchsleiter ging auf die einmal gezeigte Präferenz dadurch ein, dass er das Pelletpodest 1 cm von der Mitte des Fensters auf die Seite verschob, die der bevorzugten Vorderpfote gegenüber lag (wenn das Tier die rechte Pfote bevorzugte, wurde das Podest nach links verschoben und umgekehrt). Dadurch konnte die Ratte nach der bevorzugten Richtung entspannter greifen und geriet nicht mehr in Versuchung, die andere Pfote zum Greifen zu benutzen. Der Greifvorgang wurde auf diese Weise gezielt lateralisiert und die Hemisphäre zur Implantation der Kanüle identifiziert (Implantation in der zur bevorzugten Hand kontralateralen Hemisphäre). Neben der Händigkeit konnte auch die Ausgangsgeschicklichkeit des Tieres (Baseline) durch den prozentualen Anteil der erfolgreich abgeschlossenen Trials (Successes) erfasst werden.

Die eigentlich für das Versuchsprotokoll relevante Trainingsphase begann erst, nach Operation (ein bis zwei Tage nach dem ersten Trainingstag) und 48stündiger Erholung, mit dem zweiten Trainingstag. Diese letzte Phase dauerte dann bis zum Trainingsende am achten Tag (s. Abb. 2.3). Von diesem Zeitpunkt an wurden den Tieren 50 anstatt 25 Greifversuche erlaubt. Das Grundprinzip des Herausstreckens der bevorzugten Vorderpfote war erlernt. Nun lag der Schwerpunkt des Trainings auf der Optimierung des

Bewegungsablaufs, welcher das Greifen des Pellets ermöglichte, das eigentliche motorische Lernen (s. Abb. 2.4).



**Abbildung 2.4: Bewegungssequenz der Trainingsphase**

Typische Trainingssequenz eines erfolgreichen Greifversuchs. Das Tier benutzt zum Greifen den linken Vorderlauf.

- (1) Pelletlokalisierung
- (2) Herausstrecken der Pfote durch den Spalt
- (3) Greifversuch
- (4) Zurückführen der Pfote zum Mund
- (5) Das Fressen des Pellets gilt als erfolgreich abgeschlossener Versuch

Der Bewegungsablauf setzte sich aus dem Austrecken des Vorderlaufs, dem Positionieren der Vorderpfote über dem Futterpellet, dem Greifen des Futterpellets, dem Zurückziehen des Vorderlaufs und dem Heranführen der Pfote an den Mund zusammen. Diese Art des Greiftrainings wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits ausführlich evaluiert (Buitrago, 2005).

Zur statistischen Erfassung des Lernerfolgs diente der prozentuale Anteil an erfolgreich beendeten Trials. Auch die einzelnen Zeitintervalle während der Greifversuche wurden aufgezeichnet und ausgewertet. Das Zeitintervall eines Greifversuches wurde dazu in zwei Latenzzeiten aufgeteilt. Die zuerst gemessene Zeit  $T_{\text{door-pellet}}$  umfasst das Intervall zwischen dem Öffnen der Hebetür und dem Entfernen des Pellets vom Sensor. Diese Latenzzeit kann zusätzlich zur Erfolgsrate der Greifversuche zur Bewertung der motorischen Fertigkeit eines Tieres herangezogen werden. Mit zunehmendem Training der

Greiftechnik nimmt  $T_{\text{door-pellet}}$  ab. Die im Anschluss gemessene zweite Zeit  $T_{\text{pellet-door}}$  umfasst die Zeitspanne zwischen Pellet-Entfernung und der folgenden Türöffnung. Diese Latenz gibt unter anderem Auskunft über die Motivation und das operante Lernen eines Tieres (Buitrago, 2005; Schubring-Giese et al., 2007). Da Dopamin die Motivation beeinflussen kann (Hyman et al., 2006), ist auch diese Zeit bei der Analyse der Erfolgsrate von Interesse. Bei der Bewertung der Latenzen gilt es allerdings zu beachten, dass auch Erregung und Nervosität eines Tieres (z.B. starke Nervosität durch großes Hungergefühl) Einfluss auf die Latenzzeiten nehmen kann.

Zur visuellen Dokumentation des Trainings wurden alle Trainingssequenzen der Tiere auf Video festgehalten (Kamera A 602 fc-2; Fa. BASELER Vision Technologies).

Der Tiertrainer kannte die Gruppenzugehörigkeit der Tiere nicht.

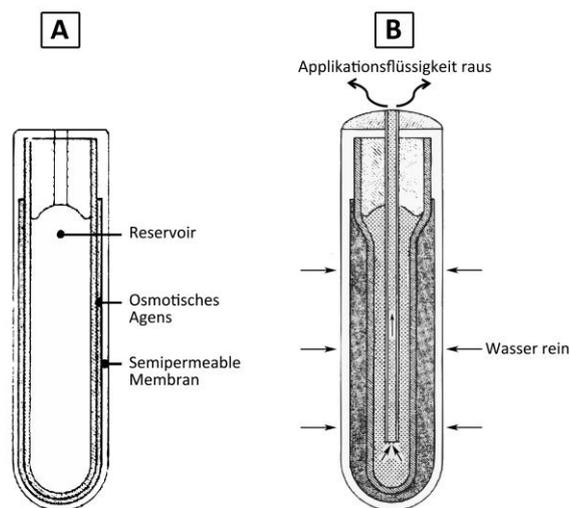
## 2.2.2 OPERATIVE IMPLANTATION DER KANÜLE UND DER OSMOTISCHEN PUMPE

### 2.2.2.1 PUMPENPRÄPARATION

Das Prinzip der osmotischen Pumpe zur kontinuierlichen Applikation einer, über die Zeit konstanten, Konzentration eines Medikaments wird seit langem genutzt (Theeuwes und Yum, 1976).

Osmose ist ein chemischer Vorgang bei dem sich Wasser über eine Membran verschiebt, die nur für Wasser, nicht aber für andere Flüssigkeiten durchlässig ist. Die treibende Kraft, die zur Verschiebung einer bestimmten Wassermenge führt, ist der Konzentrationsgradient von gelösten Teilchen in Flüssigkeit, der über die Membran aufgebaut wird, wenn die Konzentrationen der gelösten Teilchen auf beiden Seiten der Membran unterschiedlich sind. Diese Teilchen ziehen das Wasser ihrer Konzentration entsprechend verschieden stark mit osmotischer Kraft an. Dabei üben höhere Konzentrationen eine stärkere Anziehungskraft auf das Wasser aus als niedrigere Teilchenkonzentrationen. Das Wasser diffundiert auf die Seite der höheren Teilchenkonzentration und versucht dadurch einen Konzentrationsausgleich zu schaffen.

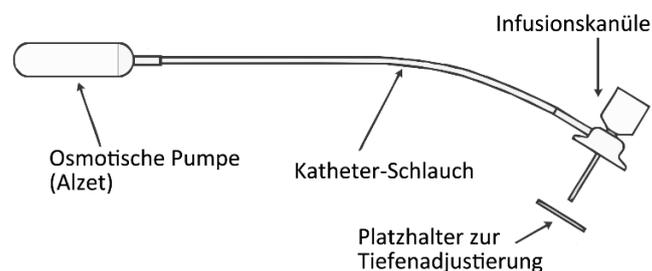
Das Pumpprinzip nutzt den Vorgang der Osmose, um die zweikammrigen Pumpenwände (hohe Teilchenkonzentration) mit Flüssigkeit aus dem Zellzwischenraum (niedrigere Teilchenkonzentration) zu füllen. Die Wände der Pumpe quellen gelartig auf und nehmen an Dicke zu. Die Eigenschaft der Inkomprimierbarkeit von Wasser sorgt dann dafür, dass der Pumpeninhalt in dem Maß ausgetrieben wird, wie das Wandvolumen zunimmt (s. Abb. 2.5).



**Abbildung 2.5: Pumpengehäuse (modifiziert nach Theeuwes und Yum, 1976)**

Abbildung A zeigt die Pumpe in leerem Zustand. Abbildung B in aktivem, gefülltem Zustand.

Die im vorliegenden Versuch implantierte osmotische Pumpe (micro-osmotic pump, model 1002®; Fa. Alzet) war Teil eines vierteiligen Infusionssystems (Abb. 2.6).



**Abbildung 2.6: Infusionssystem**

Die osmotische Pumpe war über einen Katheter-Schlauch von ca. 5 cm Länge (entsprechend der Größe des Tieres) mit der Infusionskanüle verbunden (Brain Infusion Kit 3®; Fa. Alzet). Um

die Eindringtiefe der Kanüle (Außendurchmesser 30 Gauge) besser adjustieren zu können, wurde ein Platzhalter (Spacer®; Fa. Alzet) von 0,5 mm Dicke zwischen Auflagefläche der Kanülenshalterung und Schädelknochen eingebracht.

Das gewählte Pumpenmodell hatte bei 37 °C eine mittlere Pumprate von 0,25 µl/h (SD ± 0,05 µl/h), ein Reservoir-Volumen von 90 µl und eine Arbeitsdauer von 14 Tagen. Durch ein derart niedriges Fördervolumen der Pumpe diffundiert die infundierte Lösung in einem umschriebenen Areal von 1 mm Durchmesser (Molina-Luna, 2004). Implantiert wurde die Kanülenspitze im motorischen Kortex M1, Schicht V, die Schicht mit der höchsten Dichte an D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptoren. Ein systemischer Effekt der Applikationslösung wurde auf diese Weise auf ein Minimum reduziert.

Die Ratten wurden vor der Operation nach dem Zufallsprinzip fünf verschiedenen Versuchstiergruppen zugeteilt, denen jeweils verschiedene Lösungen appliziert wurden (s. Tab. 2.1).

Gruppe	Anzahl	Lösung	Konzentration
Kontrolle	16	NaCl	0,90 %
Levodopa	13	L-Dopa [L-3,4-Dihydroxyphenylalanin-Methylester-Hydrochlorid], Ascorbinsäure, Dopa-Decarboxylaseinhibitor [Benserazid]	20 mM
D <sub>1</sub> R-Agonist	10	SKF 38393 [(±)-1-Phenyl-2,3,4,5-Tetrahydro-(1H)-3-Benzazepin-7,8-Diol-Hydrobromind]	1 µM
D <sub>2</sub> R-Agonist	9	Quinpirol [(-)-Quinpirol-Monohydrochlorid]	1 µM
D <sub>1</sub> -und D <sub>2</sub> R-Agonist	6	SKF 38393 und Quinpirol	2 x 1 µM

**Tabelle 2.1: Versuchstiergruppen-Übersicht**

Der Operateur kannte den Inhalt der Pumpen, die er implantierte, nicht. Die Kontrollgruppe mit 16 Tieren erhielt Kochsalzlösung (0.9 % NaCl), die Levodopa-Gruppe mit 13 Tieren eine 20 mM Lösung des Dopamin-Vorläufers Levodopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin-Methylester-Hydrochlorid; Fa. Sigma-Aldrich). Der L-Dopa-Lösung wurden zusätzlich Ascorbinsäure (0,2 mg/ml; Fa. Merck) und der Dopa-Decarboxylaseinhibitor Benserazid (1,2 mg/ml; Fa. Merck) zugefügt. Ascorbinsäure schützt das gelöste L-Dopa vor Degradierung bei Lichtexposition, Benserazid beugt einer vorzeitigen Decarboxylierung von Levodopa vor. Eine dritte Gruppe von zehn Tieren erhielt eine 1 µM Lösung des D<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten SKF 38393 [(±)-1-Phenyl-2,3,4,5-

Tetrahydro-(1H)-3-Benzazepin-7,8-Diol-Hydrobromind; Fa. Tocris]. Eine vierte Gruppe mit neun Tieren bekam eine 1  $\mu$ M Lösung des D<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten Quinpirol [(-)-Quinpirol-Monohydrochlorid; Fa. Sigma Aldrich] appliziert. Einer fünften Gruppe mit einer Gruppengröße von sechs Tieren wurde sowohl der D<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten SKF 38393 als auch der D<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten Quinpirol in einer äquimolaren Konzentration von je 1  $\mu$ M infundiert.

### 2.2.2.2 OPERATIONSVERFAHREN

Nach Bestimmung der Händigkeit wurden die Tiere operiert (s. Abb. 2.7).



**Abbildung 2.7: Operationssetting und -verfahren**

Die Abbildungen A und B zeigen sämtliche Operationsgeräte und das Operationsbesteck (Fa. Fine Science Tools) und geben einen Eindruck vom Operationssetting. In Abbildung C ist der Kopf des anästhesierten Tieres in den stereotaktischen Rahmen eingespannt und der Skalp eröffnet. Die Kopfhaut wird seitlich mit Fäden fixiert, so dass der Blick auf das Operationsfeld gewährleistet bleibt. Im nächsten Schritt wird die Stelle zur Kanülenimplantation aufgesucht und markiert (auf dem Bild nicht dargestellt). Abbildung D zeigt die Kanülenimplantation mit Hilfe des stereotaktischen Rahmens. Die osmotische Pumpe wurde bereits ins subkutane Fettgewebe des Nackens vorgeschoben und kommt auf dem Bild nicht mehr zur Darstellung. Auf Abbildung E sind die bereits mit Knochenzement (FLOWline®; Fa. Heraeus Kulzer) fixierte Kanülenhalterung (weiß und zentral im Bild gelegen) und die kontralateral dazu implantierte Schraube für eine bessere Kanülenfixation zu sehen. Abbildung F zeigt den Rattenschädel nach

---

völligem Verschluss des Operationsgebiets mit einem Zweikomponentenkleber (Paladur®; Fa. Heraeus Kulzer).

Für die Implantation der Infusionskanüle und der osmotischen Pumpen wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Applikation einer Mischung aus Ketamin (10 %; Fa. Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte AG), 10 mg/kg KG und Xylazin (2 % Xylazinhydrochlorid; Fa. Albrecht GmbH), 8 mg/kg KG anästhesiert (Empfehlung der Einrichtung für Tierschutz, Tierärztlichen Dienst und Labortierkunde, Tübingen). Der Schädel des narkotisierten Tieres wurde in einen stereotaktischen Rahmen (Lab Standard Stereotaxic-Single; Fa. Staling) eingespannt. Nach Rasur und Desinfektion des Operationsgebiets wurde der Schädelknochen freipräpariert (s. Abb. 2.7 C) und die Stelle für die Implantation der Kanüle aufgesucht. Dabei war die Kanüle in der zur bevorzugten Vorderpfote kontralateralen Hemisphäre zu implantieren. Das Bregma (Schnittpunkt von Kranz- und Pfeilnaht) galt als Bezugspunkt (1 mm oral und 3 mm lateral Bregma), um die Stelle des Schädels aufzusuchen, die über dem primärmotorischen Kortexareal M1 lag. Die Koordinaten für die Implantation beruhen auf publizierten Daten zur Somatotopie des Rattenkortex (Neafsey et al., 1986) und wurden bereits in zurückliegenden Experimenten zur Lagebestimmung des M1-Areals verwendet (Luft et al., 2004). Durch die Schädelkalotte über dem M1-Areal wurde ein rundes Fenster von 1,5 mm Durchmesser gebohrt. Außerdem wurde die Dura an dieser Stelle mit einer Pinzette abgetragen, damit die Kanüle ohne Widerstand 900 µm tief in den motorischen Kortex eingeführt werden konnte. Des Weiteren wurde über dem Areal des präfrontalen Kortexes, auf der der Kanüle gegenüberliegenden Seite, eine Schraube befestigt, die der zusätzlichen Fixation der implantierten Kanüle diente. Eine gut fixierte Auflage der Kanüle auf dem Schädelknochen war nötig, weil die Tiere sich nach der Operation wieder frei bewegten und mit Manipulationen am Implantat zu rechnen war. Mit Hilfe des stereotaktischen Rahmens wurde die Kanüle dann platziert und das Pumpgehäuse der osmotischen Pumpe in das subkutane Fettgewebe der Nackenregion des Tieres implantiert (s. Abb. 2.7 D). Über den Katheterschlauch blieb die Pumpe weiterhin mit der Kanüle verbunden. Dann wurde die Kanüle mit Knochenzement am Schädelknochen und über eine Zementbrücke an der kontralateralen Schraube fixiert

(s. Abb. 2.7 E). Nach Aushärtung des Zements wurde die Operationswunde mit Nähten verschlossen. Um eine komplette Deckung des Schädelknochens zu erreichen und um möglichst wenig Fadenmaterial zu gebrauchen (da die Tiere den Faden durch Manipulation schnell lockern konnten), wurde auf die Dehiszenzzone noch ein schnell härtendes Kaltpolymerisat (Paladur®; Fa. Heraeus Kulzer) aufgetragen (s. Abb. 2.7 F).

Die Operationszeit betrug 45 min pro Tier. Durch Nachinjektion von Ketamin wurde die Anästhesie aufrechterhalten. In der Phase des Erwachens wurde dem Tier 0,5 ml des Morphinderivats Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic®; Fa. Essex Pharma GmbH) intraperitoneal appliziert, um die postoperativen Schmerzen zu lindern. Bis das Tier erwachte, wurde es auf eine, die Körpertemperatur konstant haltende, Unterlage gelegt.

---

### 2.2.2.3 TÖTUNGSMETHODE: PERFUSION

Nach Beendigung der acht Trainingstage wurden die Tiere getötet und ihre Gehirne konserviert. Dazu wurden die Ratten zunächst mit einer potentiell letalen Dosis einer Ketamin-Xylazin-Mischung in den Zustand tiefster Anästhesie versetzt, um dann transkardial bei noch schlagendem Herzen perfundiert zu werden. Dies erfolgte als erstes mit einem 1%igen Phosphatpuffer, der eine Blutleere des Gehirns erzeugen sollte (phosphat buffer saline, PBS; Fa. Merk), danach – zur Fixation des Gewebes – mit 4 % Formalin enthaltender PFA-Lösung (Paraformalinaldehyd, PFA; Fa. Fluka). Es folgte die Dekapitation mit einer Guillotine (Decapitator for large rodents; Fa. World Precision Instruments) und die Dissektion der Gehirne aus dem knöchernen Schädel. Die Blutleere war nötig, um im Anschluss an die Perfusion die Gehirne histologisch aufzuarbeiten.

---

## 2.2.3 AUFARBEITUNG DER GEHIRNE

---

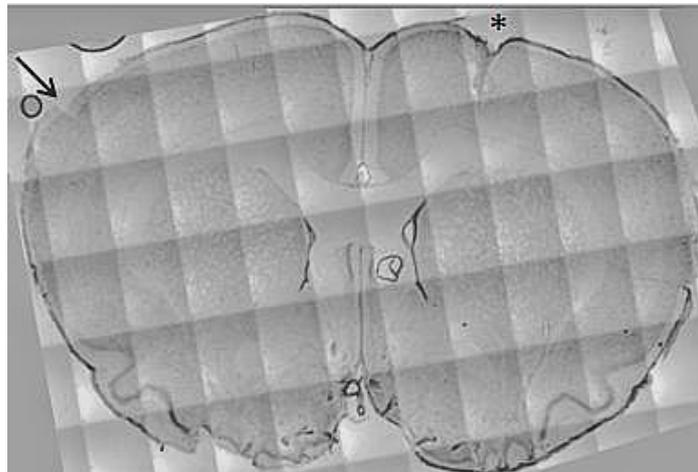
### 2.2.3.1 ANFERTIGUNG DER HIRNSCHNITTE

Zur weiteren Konservierung wurden die Gehirne für einen Tag in einer 4%igen PFA-Lösung aufbewahrt und am zweiten Tag in eine PFA-Zuckerlösung mit 20 % Zuckern-

teil transferiert. Nach drei Tagen erfolgte die Schockgefrierung bei  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer Methylbutanlösung (2-Methylbutan; Fa. Merck). Von den tiefgefrorenen Gehirnen konnten dann am Cryostat (CM 3050; Fa. Leica)  $50\text{ }\mu\text{m}$  dünne Hirnschnitte angefertigt werden, die bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einem 1%igem PBS-Puffersystem aufbewahrt wurden.

### 2.2.3.2 HISTOLOGISCHE FÄRBUNG NACH NISSEL

Die Färbetechnik nach Nissel ist zur Darstellung von Nervenzellkörpern und Hirnrindenschichten geeignet und diente im beschriebenen Experiment dazu, die Lokalisation der Kanüle zu beurteilen (s. Abb. 2.8).



#### **Abbildung 2.8: Lokalisation der Kanüle im M1-Areal des motorischen Kortex der Ratte**

Die Kanüle hinterlässt nach ihrer Entfernung am präparierten und gefärbten Gehirn einen Stichkanal (\*), der der Kanülenlokalisierung *in vivo* entspricht. Auf diese Weise kann die korrekte Kanülenlage *post mortem* überprüft werden. In der Abbildung wurde die Kanüle in den rechten M1, Schicht V, implantiert. Auf der kontralateralen Seite wurde durch einen Skalpellschnitt (Pfeil) die nicht implantierte Seite markiert, um den Stichkanal der Kanüle am Präparat besser auffinden zu können.

Für die Färbung wurden die Hirnschnitte auf Objektträgern transferiert und nacheinander in verschiedene Lösungen getaucht: kurzes Eintauchen in 70 % Ethanol (Ethanol absolut zur Analyse; Fa. Merck) gelöst in destilliertem Wasser, 3 min Eintauchen in 10%ige Essigsäure (Essigsäure; Fa. Sigma-Aldrich) gelöst in Ethanol, dann kurzes Ein-

tauchen in destilliertes Wasser, danach für 7 min in eine Cresylviolett-Lösung (Cresylviolett; Fa. Merck), zum Ausdifferenzieren in 10%ige Essigsäurelösung in Ethanol, dann für 1 min in 100%ige Ethanollösung und zuletzt für 5 min eintauchen in eine Xylollösung (Xylo; Fa. BDH-Prolabo). Um die gefärbten Präparate zu fixieren, wurden die Schnitte mit einem Fixiermittel (DPX Mountain®; Fa. Fluka) überzogen und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Nach Trocknung wurden die Präparate unter dem Mikroskop (Axiovert 200 M; Fa. Zeiss) mit dem Programm Axio Vision 4.6® ausgewertet, wobei die Tiefe und Lage der Infusionskanülen vermessen wurde. Zur Dokumentation wurden Bilder aufgenommen (Kameramodell: Axio Cam MRm; Fa. Zeiss; s. Abb. 2.8).

### 2.3 STATISTISCHE VERFAHREN

Die Rohdaten der Greifversuche wurden über den Cagemaster, ein zentrales Steuerelement, das zwischen Trainingskammer und PC geschaltet war, an den PC übermittelt. Zur weiteren Datenanalyse und -visualisierung wurden die Daten in das Statistikprogramm JMP (Version 7.02; [www.jmp.com](http://www.jmp.com)) importiert.

Nach Logit-Transformation der Rohdaten wurden die Lernkurvenverläufe der einzelnen Tiergruppen mittels Varianzanalyse über die acht Trainingstage miteinander und gegen die Kontrollgruppe verglichen. Die erfolgreichen Greifversuche pro Trainingstag, die mit dem Fressen des Pellets beendet wurden (Successes), waren das Maß für den Lernerfolg. Zur Visualisierung der Daten wurde eine getrennte Darstellung der Lernkurvenverläufe auf Grundlage des Rohdatensatzes und der  $\pm 95\%$ -Konfidenzintervalle, basierend auf dem transformierten Datensatz, gewählt.

Eine zweite Varianzanalyse untersucht den Einfluss der Applikationslösungen auf den Kurvenverlauf der Latenzzeiten  $T_{\text{door-pellet}}$  und  $T_{\text{pellet-door}}$  der Tiergruppen über die acht Trainingstage. Zur Auswertung wurde für jeden Trainingstag eine mittlere Latenz  $T_{\text{door-pellet}}$  und  $T_{\text{pellet-door}}$  aus den Einzellatenzen pro Tag gebildet. Zur graphischen Darstellung wurden die Werte in logarithmierter Form aufgetragen.

Weitere Analysen dienten dem Ausschluss systematischer Fehler. Mittels Varianzanalyse wurde die Altersverteilung der Tiere auf signifikante Altersunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen geprüft. Dafür wurde der Mittelwert des Alters der Tiere am Operationstag herangezogen, die Standardabweichung vom Mittelwert ist mit  $\pm$  SD angegeben. Eine Kovarianzanalyse untersuchte, ob das Alter der Tiere einen Einfluss auf die Latenzverläufe hatte. Eine weitere Kovarianzanalyse diente der Beantwortung der Frage, ob das Alter der Tiere mit der Anzahl erfolgreicher Greifversuchen korreliert. Mittels Varianzanalyse wurde geprüft, ob die Händigkeit einen Einfluss auf die Successrate hat. Der Gewichtsverlauf der einzelnen Tiere über die acht Tage wurde ausgewertet und daraufhin untersucht, ob extreme Gewichtsschwankungen auf den Lernkurvenverlauf Auswirkungen haben. Eine letzte Varianzanalyse sollte klären, ob die Anzahl der erfolgreichen Greifversuche mit den Latenzzeiten der Tiere korreliert.

Für alle Auswertungen wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha < 0,05$  angenommen. Alle Tage, an denen die Kurvenverläufe der Verumgruppen signifikant vom Kurvenverlauf der Kontrollgruppe abweichen, sind mit einem \* markiert.

In den Graphiken zur Darstellung der Lernkurven über die acht Trainingstage entsprechen die Punkte den Mittelwerten erfolgreicher Greifversuche pro Tag. Die Balken sind Fehlerindikatoren und geben das  $\pm 95$  %-Konfidenzintervall der Mittelwerte an.

In den Graphiken zur Darstellung des Verlaufs der Latenzzeiten (Türöffnung bis Türschluss nach Pelletentfernung) über die acht Trainingstage entsprechen die Punkte den Mittelwerten der Latenzzeiten an einem Trainingstag. Die Balken sind ebenfalls Fehlerindikatoren ( $\pm 95$  %-Konfidenzintervall des Mittelwerts).

Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. K. Dietz, Institut für Medizinische Biometrie, Tübingen.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 EINFLÜSSE VON DOPAMIN UND SEINER SELEKTIVEN REZEPTORAGONISTEN AUF DAS MOTORISCHE LERNEN

Um die Funktion des Dopamins und seiner verschiedenen Rezeptoren beim Erlernen von Bewegungsabläufen am gesunden Tier zu untersuchen, wurden der direkte Dopaminvorläufer Levodopa und die selektiven D<sub>1</sub>- bzw. D<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten SKF 38393 und Quinpirol lokal in den motorischen Kortex der jeweiligen Ratte appliziert. Eine vierte Versuchstiergruppe erhielt eine äquimolare Lösung beider Agonisten. Die Kontrollgruppe bekam physiologische Kochsalzlösung instilliert.

##### 3.1.1 EINFLÜSSE AUF DIE ANZAHL DER ERFOLGREICHEN GREIFVERSUCHE

Abbildung 3.1 zeigt die Lernkurven der einzelnen Versuchstiergruppen über die acht Trainingstage.

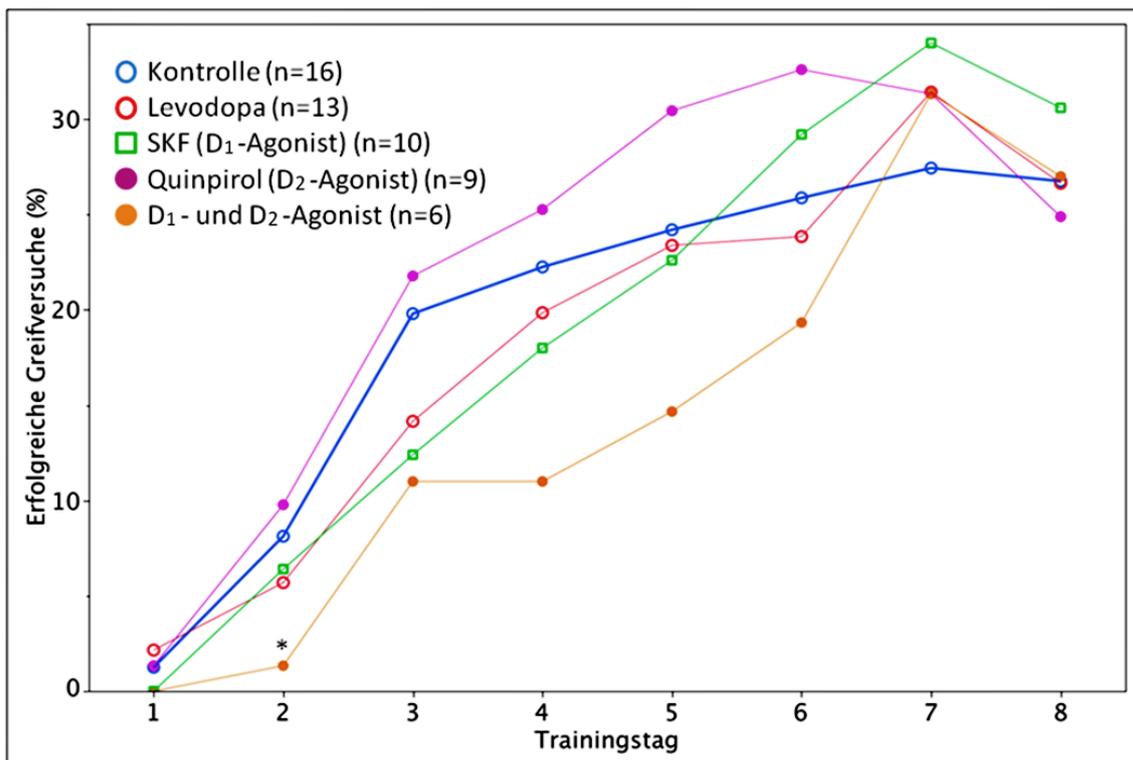


Abbildung 3.1: Lernkurven der fünf Versuchstiergruppen

Die Lernkurven der einzelnen Verumgruppen sind gegen die Kontrollgruppe (blauer, offener Kreis, dicke Linie) aufgetragen. Ein Lernkurvenplateau für alle Kurven zeichnet sich ab dem sechsten Trainingstag ab. Die Kurvenverläufe unterscheiden sich an keinem der acht Trainingstage signifikant voneinander, mit einer Ausnahme: an Tag zwei ist die Successrate der Gruppe D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Agonist signifikant schlechter als die Successrate der Kontrollgruppe,  $p = 0,027$  (Tag ist mit \* markiert). Die Interaktion von Gruppe und Tag liegt mit  $p_{\text{Success}} (\text{Gruppe} \times \text{Tag}) = 0,130$  deutlich über dem Signifikanzniveau. Die Performanceleistung hängt dabei signifikant vom Trainingstag ab,  $p_{\text{Success}} (\text{Tag}) < 0,0001$ . Die Gruppengrößen variieren, mit  $n(\text{gesamt}) = 54$ , bei:  $n(\text{Kontrolle}) = 16$ ;  $n(\text{Levodopa}) = 13$ ,  $n(\text{D}_1\text{-Agonist}) = 10$ ,  $n(\text{D}_2\text{-Agonist}) = 9$ ,  $n(\text{D}_1\text{- und D}_2\text{-Agonist}) = 6$ . Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha < 0,05$  festgelegt. Für die  $\pm 95\%$ -Konfidenzintervalle der Mittelwerte der erfolgreichen Greifversuche/Tag siehe Abbildung 3.2.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die 95 %-Konfidenzintervalle der Mittelwerte der erfolgreichen Greifversuche pro Tag getrennt vom Lernkurvenverlauf in einer zweiten Graphik dargestellt (s. Abb. 3.2).

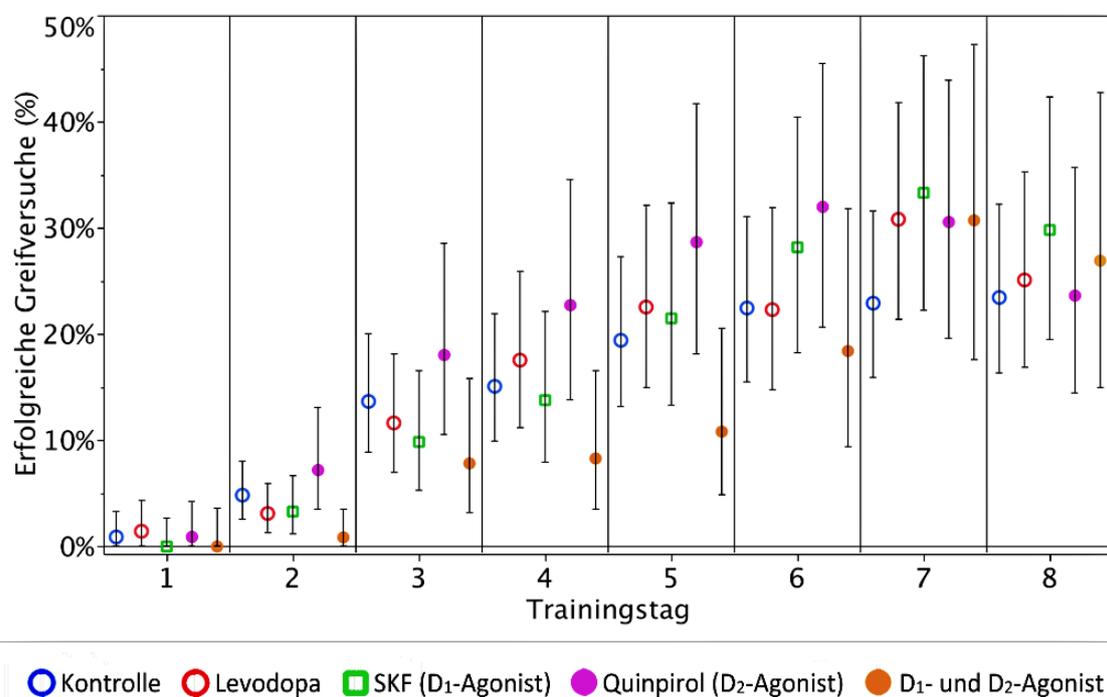


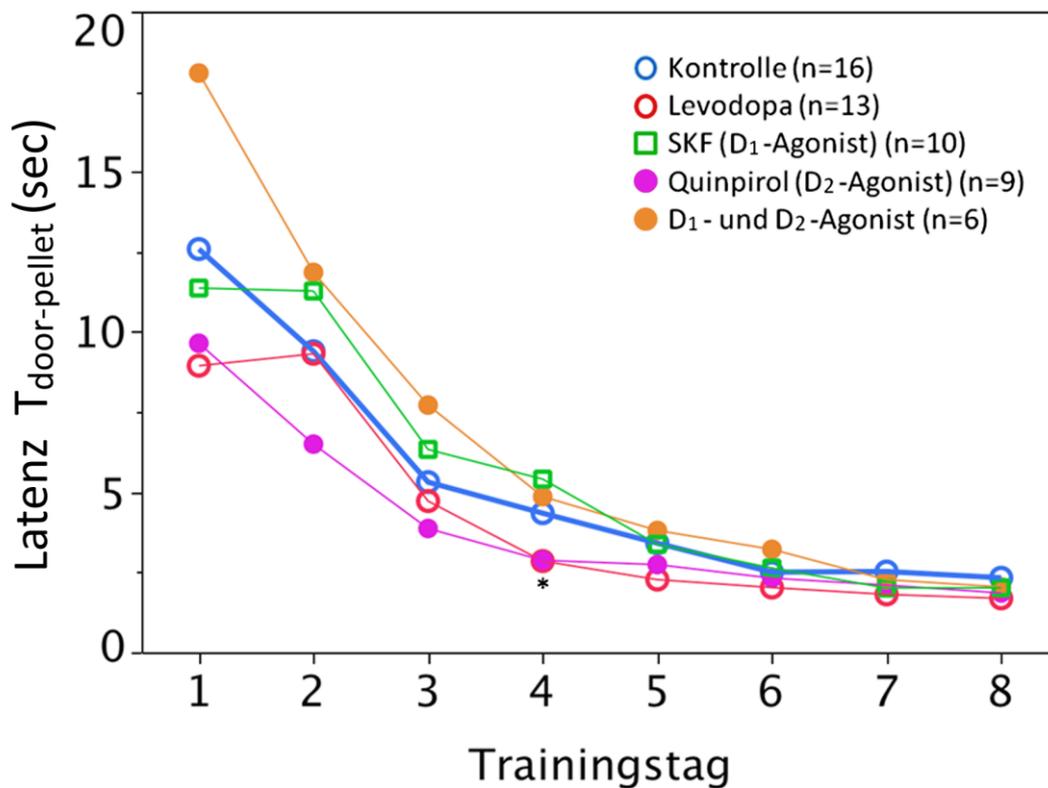
Abbildung 3.2:  $\pm 95\%$ -Konfidenzintervalle der Mittelwerte der erfolgreichen Greifversuche pro Tag

Die Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen, dass alle Tiere nach Ablauf der acht Trainingstage ein ähnliches Lernplateau mit einer Successrate von ca. 25 % erfolgreicher Greifversuche pro Trainingstag erreichen. Die Steigung der einzelnen Lernkurven an den ersten Lerntagen scheint dabei je nach Gruppe zu variieren. Tendenziell lernt die Gruppe initial am schnellsten, die den D<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten Quinpirol instilliert bekommt. Am langsamsten lernt die Gruppe, denen der D<sub>1</sub>-Rezeptoragonist SKF 38393 und der D<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten Quinpirol simultan und in äquimolarer Konzentration appliziert wird, an Tag zwei ist die Successrate dieser Gruppe sogar signifikant schlechter als die der Kontrollgruppe,  $p = 0,027$ . Zwischen dem zweiten und dritten Tag scheint die Phase des größten Lernfortschritts zu liegen. Die Interaktion von Gruppe und Tag ist mit  $p_{\text{Success}}(\text{Gruppe} \times \text{Tag}) = 0,130$  nicht signifikant. Dagegen hat die Anzahl der Trainingstage einen hoch signifikanten Einfluss auf die Successrate. Je mehr Tage die Tiere trainiert wurden, desto besser wurde ihre Leistung,  $p_{\text{Success}}(\text{Tag}) < 0,0001$ . Man beachte, dass die Konfidenzintervalle an den letzten Trainingstagen immer breiter werden. Damit hat das Lernmodell seine stärkste Aussagekraft an den ersten Trainingstagen. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Gruppengrößen variieren, dabei sind Lernkurvenverläufe von Gruppen mit höherer Tierzahl ( $n$ ) weniger gefährdet durch einen biologischen Bias (systematischer Fehler, der in der biologischen Variabilität des Rattenindividuums begründet liegt) verzerrt zu sein.

### 3.1.2 EINFLÜSSE AUF DIE LATENZZEITEN

#### 3.1.2.1 LATENZZEITEN $T_{\text{DOOR-PELLET}}$

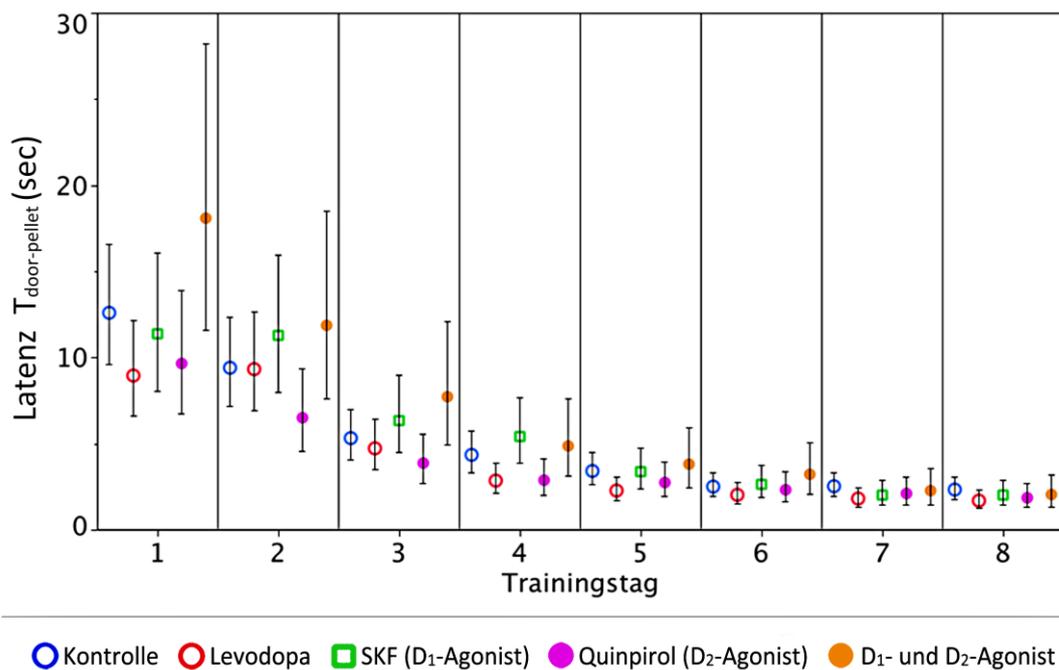
Abbildung 3.3 gibt den Verlauf der Latenzzeiten  $T_{\text{door-pellet}}$  über die acht Trainingstage wieder. Die aufgetragenen Latenzzeiten sind als tägliche Mittelwerte der benötigten Zeiten zu verstehen, die die Tiere benötigen, um nach Türöffnung das Pellet vom Po-dest zu greifen und dadurch den Türschlussmechanismus auszulösen.



**Abbildung 3.3: Latenzzeiten  $T_{\text{door-pellet}}$  der fünf Versuchstiergruppen**

Die Latenzzeiten der einzelnen Verumgruppen sind gegen die Kontrollgruppe (blauer, offener Kreis, dicke Linie) aufgetragen. Die Zeiten nehmen gegen den achten Trainingstag hin deutlich ab. Ein Plateau wird am sechsten Trainingstag erreicht. Es existiert keine signifikante Interaktion von Gruppe und Tag,  $p_{\text{Latenz\_door-pellet}}(\text{Gruppe} \times \text{Tag}) = 0,25$ . Die Verkürzung der Latenzzeiten korreliert dagegen hoch signifikant mit dem Trainingstag,  $p_{\text{Latenz\_door-pellet}}(\text{Tag}) < 0,0001$ . An Tag vier haben die Tiere der Levodopa-Gruppe signifikant kürzere Latenzzeiten  $T_{\text{door-pellet}}$  als die Tiere in der Kontrollgruppe,  $p = 0,042$  (Tag ist mit \* markiert). Am Tag fünf wird das Signifikanzniveau dieser Beobachtung mit  $p = 0,05$  knapp verfehlt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha < 0,05$  festgelegt. Für die  $\pm 95\%$ -Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Latenzzeiten siehe Abbildung 3.4.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die 95 %-Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Latenzzeiten  $T_{\text{door-pellet}}$  pro Tag getrennt vom Kurvenverlauf dargestellt (s. Abb. 3.4).

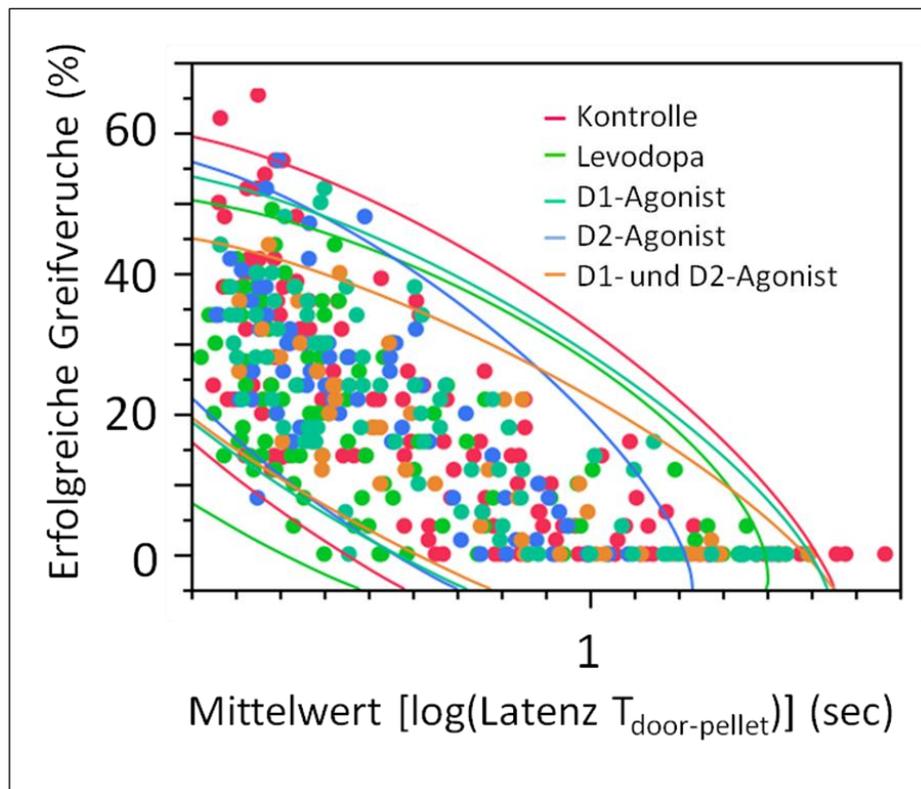


**Abbildung 3.4:**  $\pm 95\%$ -Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Latenzzeiten  $T_{\text{door-pellet}}$  pro Trainingstag

Gegen Ende des Trainings werden die Konfidenzintervalle und damit auch die Streuung um die Mittelwerte immer kleiner und die Aussagekraft der Werte immer größer.

Es kann eine deutliche Verkürzung der Latenzzeiten über die acht Trainingstage in allen Gruppen beobachtet werden. Wie bei den Lernkurven, zeichnet sich auch bei den Latenzzeiten  $T_{\text{door-pellet}}$  ab dem sechsten Trainingstag die Ausbildung eines Plateaus in allen Gruppen ab. An allen folgenden Trainingstagen verkürzt sich die Zeit für das Heruntergreifen des Pellets vom Podest nur noch um Sekundenbruchteile. Es existiert keine signifikante Interaktion von Gruppe und Tag,  $p_{\text{Latenz\_door-pellet}}(\text{Gruppe} \times \text{Tag}) = 0,25$ . Die Untersuchung auf signifikante Latenzzeitunterschiede zwischen den Verumgruppen und der Kontrollgruppe an den einzelnen Tagen ergibt, dass am Tag vier die Tiere der Levodopa-Gruppe signifikant schneller das Pellet vom Podest greifen, als die Tiere aus der Kontrollgruppe dies tun,  $p = 0,042$ . Auch am Tag fünf zeichnet sich diese Tendenz ab, wenn auch mit  $p = 0,05$  nicht mehr streng signifikant.

Die zeitliche Entwicklung der Erfolgsraten und Latenzzeiten  $T_{\text{door-pellet}}$  ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Es besteht eine hoch signifikante, negative Korrelation der beiden Größen.



**Abbildung 3.5: Negative Korrelation von erfolgreichen Greifversuchen und den Latenzzeiten**

$T_{\text{door-pellet}}$

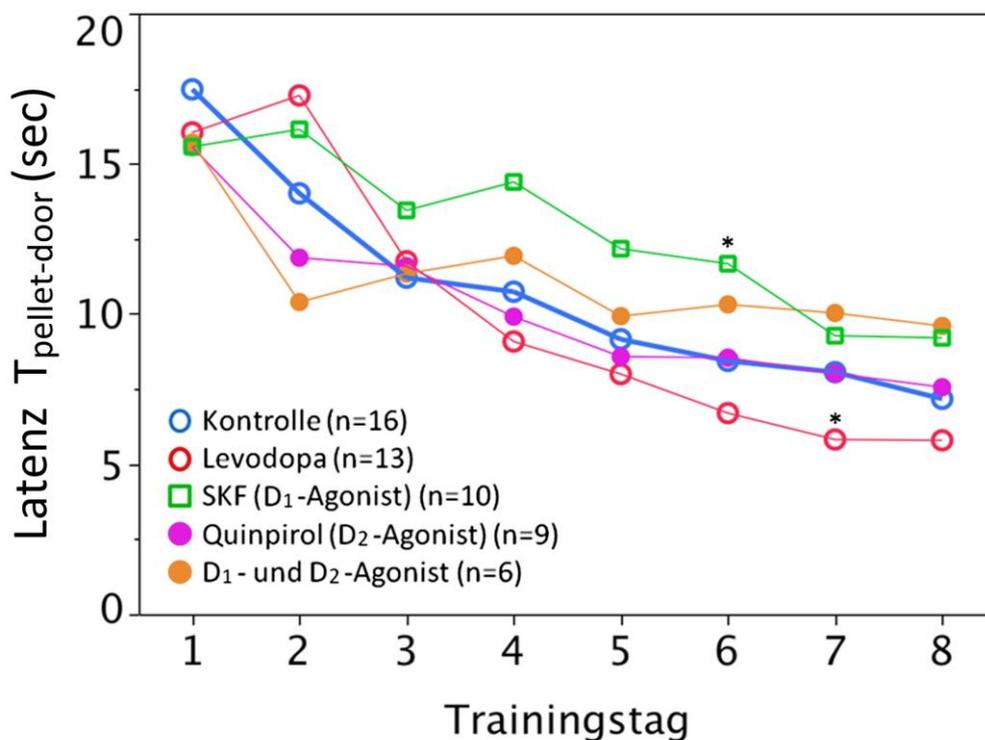
Die Graphik stellt die Korrelation der Erfolgsrate der Greifversuche mit den Latenzzeiten  $T_{\text{door-pellet}}$  dar. Jede Ellipse (ovale Kurve) entspricht dabei einer Versuchstiergruppe, die einzelnen Punkte den Trainingstagen der Tiere (Kontrollgruppe hier mit roten Punkten und roter Ellipse dargestellt). Die Überlappung der negativ geneigten Ellipsen zeigt, dass in allen Versuchstiergruppen eine nahezu gleich große, negative Korrelation der gegeneinander aufgetragenen Größen besteht (die Korrelationskonstanten für die Gruppen Kontrolle,  $D_1$ -Agonist,  $D_2$ -Agonist,  $D_1$ - und  $D_2$ -Agonist betragen jeweils -0,8, die Korrelationskonstante der Levodopa-Gruppe -0,7). Die Korrelation ist in allen Gruppen mit  $p_{\text{Success}}(\text{Latenz } T_{\text{door-pellet}}) < 0,0001$  hoch signifikant.

Ob diese Korrelation einen kausalen Zusammenhang abbildet, kann mit den vorliegenden Daten nicht bewiesen werden. Die zeitliche Entwicklung der beiden Parameter

könnte auch zufälligerweise gegenläufig verlaufen, ohne dass sich die Größen dabei gegenseitig beeinflussen.  $T_{\text{door-pellet}}$  als Maß zur Beurteilung der motorischen Fertigkeiten heranziehen ist somit problematisch.

### 3.1.2.2 LATENZZEITEN $T_{\text{PELLET-DOOR}}$

Abbildung 3.6 gibt den Verlauf der Latenzzeiten  $T_{\text{pellet-door}}$  über die acht Trainingstage wieder. Die aufgetragenen Latenzzeiten sind als tägliche Mittelwerte der gemessenen Zeiten zu verstehen, die die Tiere benötigen, um nach Entfernen des Pellets vom Postdest erneut die Hebetür zu öffnen.

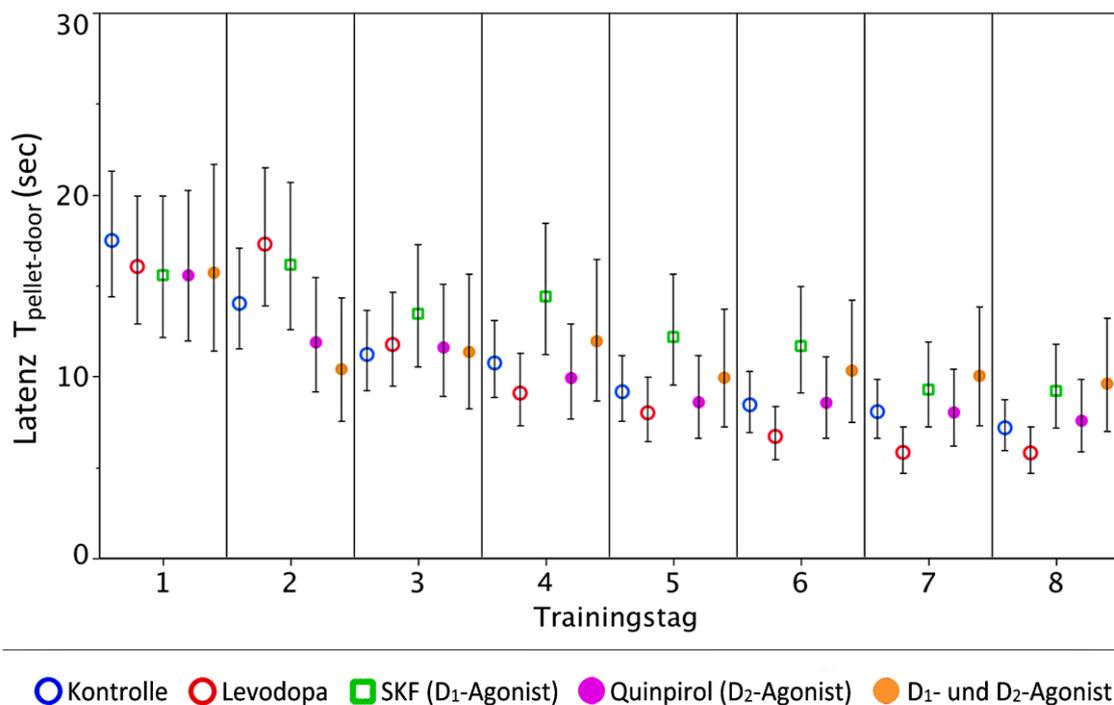


**Abbildung 3.6: Latenzzeiten  $T_{\text{pellet-door}}$  der fünf Versuchstiergruppen**

Die Latenzzeiten der einzelnen Verumgruppen sind gegen die Kontrollgruppe (blauer, offener Kreis, dicke Linie) aufgetragen. Die Zeiten aller fünf Versuchstiergruppen nehmen gegen den achten Trainingstag hin ab. Ein deutliches Plateau wird erst am siebten Trainingstag erreicht. Der Verlauf der Latenzzeiten über die Trainingstage ist signifikant,  $p_{\text{Latenz\_pellet-door}}(\text{Gruppe} \times \text{Tag}) = 0,0003$ . Die Verkürzung der Latenzzeiten korreliert dabei signifikant mit dem Trainingstag,  $p_{\text{Latenz\_pellet-door}}(\text{Tag}) < 0,0001$ . Am sechsten Trainingstag ist die die

Latenzzeit  $T_{\text{pellet-door}}$  der  $D_1$ -Agonisten-Gruppe signifikant länger als die der Kontrollgruppe,  $p = 0,04$ . Am Tag sieben ist die Latenzzeit der Levodopa-Gruppe signifikant kürzer als die Zeit der Kontrollgruppe,  $p = 0,03$  (von der Kontrollgruppe signifikant unterschiedliche Tage sind mit \* markiert). Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha < 0,05$  festgelegt. Für die  $\pm 95$  %-Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Latenzzeiten siehe Abbildung 3.7.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die 95 %-Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Latenzzeiten  $T_{\text{pellet-door}}$  pro Tag getrennt vom Kurvenverlauf dargestellt (s. Abb. 3.7).



**Abbildung 3.7:  $\pm 95$  %-Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Latenzzeiten  $T_{\text{pellet-door}}$  pro Trainingstag**

Die Konfidenzintervalle und damit auch die Streuung der Mittelwerte sind an allen Trainingstagen vergleichbar klein.

Bei den Latenzzeiten  $T_{\text{pellet-door}}$  wird wie bei den Latenzen  $T_{\text{door-pellet}}$  eine Verkürzung der Zeiten gegen Ende des Trainings in allen Gruppen beobachtet. Der Kurvenverlauf ist allerdings weniger steil abfallend und ein Plateau wird erst am siebten Tag erreicht. Der Kurvenverlauf der Zeiten über die acht Tage ist mit

$p_{\text{Latenz\_pellet-door}}(\text{Gruppe} \times \text{Tag}) = 0,0003$  signifikant. Bei der Untersuchung der einzelnen Tage auf signifikante Unterschiede der Gruppen gegen Kontrolle zeigt sich am Tag sechs, dass die D<sub>1</sub>-Agonisten-Gruppe signifikant langsamer beim erneuten Türöffnen ist als die Kontrollgruppe ( $p = 0,04$ ), am Tag sieben, dass die Levodopa-Tiere signifikant schneller sind als die Kontrolltiere ( $p = 0,03$ ).

Die Latenzzeiten  $T_{\text{pellet-door}}$  können eine orientierende Größe für die Beurteilung von Motivation und operantes Lernen eines Tieres sein (Buitrago, 2005; Schubring-Giese et al., 2007). Generell ist bei der Beurteilung der Latenzen die Verzerrung der Ergebnisse durch Erregung, Nervosität oder Ähnliches zu berücksichtigen. Auch in diesem Fall beweist die Korrelation den kausalen Zusammenhang der beiden Größen nicht, sie legt ihn lediglich nahe.

Dass die Successrate mit den Latenzen  $T_{\text{pellet-door}}$  korreliert ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

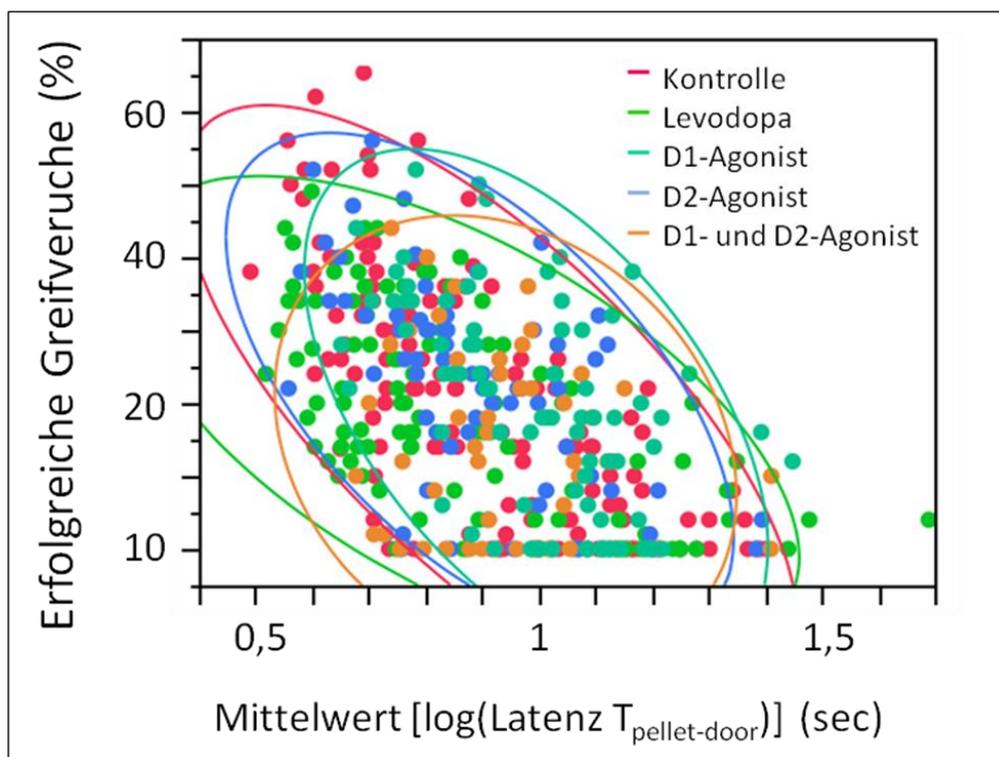


Abbildung 3.8: Negative Korrelation von erfolgreichen Greifversuchen und Latenzzeiten

$T_{\text{pellet-door}}$

Die Graphik stellt die Korrelation der Erfolgsrate der Greifversuche mit den Latenzzeiten  $T_{\text{pellet-door}}$  dar. Jede Ellipse entspricht dabei einer Versuchstiergruppe, die einzelnen Punkte den Trainingstagen der Tiere (Kontrollgruppe hier mit roten Punkten und roter Ellipse dargestellt). Die Überlappung der negativ geneigten Ellipsen zeigt, dass in allen Versuchstiergruppen eine nahezu gleich große, negative Korrelation besteht (die Korrelationskonstanten für die Kontrollgruppe beträgt -0,7, die Korrelationskonstante der D<sub>1</sub>-Agonisten-Gruppe -0,5, die Korrelationskonstante der D<sub>2</sub>-Agonisten-Gruppe beträgt -0,6, alle drei Korrelationen sind jeweils mit einem  $p < 0.0001$  signifikant. Die Korrelationskonstante der D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Agonisten-Gruppe beträgt -0,2 und ist mit einem p-Wert von 0,13. nicht signifikant.

### 3.2 AUSSCHLUSS SYSTEMATISCHER FEHLER (BIAS)

Das Alter der Tiere in den verschiedenen Gruppen am Operationstag lag bei durchschnittlich 69,4 Tagen ( 6,1 d). Zwischen den Tiergruppen gab es keine signifikanten Altersunterschiede ( $p(\text{Alter} \times \text{Gruppe}) = 0,80$ ). Die kleinen vorhandenen Altersunterschiede hatten dabei keinen Einfluss auf die gemessenen Latenzzeiten ( $p_{\text{Latenz}}(\text{Alter}) = 0,75$ ) und die Anzahl der erfolgreichen Greifversuche ( $p_{\text{Success}}(\text{Gruppe}) = 0,64$ ). Auch hatte die Händigkeit der Tiere, das heißt die Präferenz der rechten oder linken Vorderpfote, keinen Einfluss auf die Successrate ( $p_{\text{Success}}(\text{Händigkeit}) = 0,58$ ).

Ob der Gewichtsverlauf einen Einfluss auf den Erfolg der Greifversuche hat, kann nicht sicher ausgeschlossen werden, da zu dieser Analyse nicht nur das absolute Gewicht an den einzelnen Trainingstagen in Betracht gezogen werden muss, sondern insbesondere der Gewichtsverlauf im Bezug zum Ausgangsgewicht. Überdies haben gleich große Gewichtsschwankungen bei Tieren unterschiedlichen Ausgangsgewichts vermutlich verschiedene Auswirkungen auf das Verhalten des jeweiligen Tieres. Das einzige Mittel, um diesen Bias zu minimieren ist, das Ausgangsgewicht in einem bestimmten Rahmen (227 g–290 g) und das Gewicht der Tiere so konstant wie möglich zu halten. Das mittlere Ausgangsgewicht betrug 257,05 g, die maximale Gewichtsbeugung 30 g. Dies entspricht 11,7 % des mittleren Ausgangsgewichts. Wir halten dies für keine rele-

vante Schwankung. Generell gilt für den Gewichtsverlauf, dass die meisten Tiere nach den acht Trainingstagen gegenüber dem Ausgangsgewicht an Gewicht verloren haben.

## 4 DISKUSSION

Der motorische Kortex, Area M1, scheint unmittelbar am Prozess des motorischen Lernens und Erinnerns beteiligt zu sein (Riout-Pedotti et al., 1998; Sanes und Donoghue, 2000; Luft et al., 2004; Harms et al., 2008; Molina-Luna et al., 2009). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass der Überträgerstoff Dopamin hierbei eine Schlüsselrolle spielt (Williams und Goldman-Rakic, 1993; Buitrago, 2005; Floel et al., 2005; Kuo et al., 2008; Hosp et al., 2009; Molina-Luna et al., 2009). Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, dem Verständnis über Funktion und Wirkmechanismus des Neurotransmitters Dopamin in M1 während der einzelnen Lernphasen näher zu kommen.

Unsere tierexperimentelle Studie zeigt, dass der Dopamineffekt in M1 komplex ist und weitere Studien für ein gutes Verständnis nötig sind. Gesunde Tiere lernen unter einer kontinuierlichen Levodopainfusion nicht besser als Kontrolltiere. Auch die Ko-Applikation der beiden Rezeptoragonisten bringt keinen Lernvorteil. Ohne einen positiven Levodopaeffekt ist dieser auch nicht zu erwarten. Am zweiten Trainingstag lernten die Tiere mit Ko-Applikation sogar signifikant schlechter als die Kontrolltiere. Tendenziell am besten lernten die Tiere, die nur den D<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten instilliert bekamen. Die erhaltenen Ergebnisse widerlegen unsere Arbeitshypothese, bei der wir davon ausgegangen sind, dass gesunde Tiere unter Dopamindauerapplikation besser lernen. Unsere Daten stehen damit im Gegensatz zu bereits vorliegenden Erkenntnissen zur Dopaminfunktion. Auch auf zellulärer Ebene ist die bisherige Datenlage zur Dopaminfunktion widersprüchlich (Seamans et al., 2001; Seamans und Yang, 2004). Wie kann man sich nun erklären, dass die genaue Dopaminfunktion uns weiterhin verborgen bleibt?

### 4.1 METHODISCHE ASPEKTE

#### 4.1.1 BESONDERHEITEN DES DOPAMINS

(1) Der Dopamineffekt ist abhängig von der Zytoarchitektur der Hirnrindenschicht, in die der Transmitter appliziert wird. Diese Tatsache ergibt sich aus dem Nachweis der

---

inhomogenen Dopaminrezeptorverteilung im motorischen Kortex bei Tier und Mensch (Descarries et al., 1987; Doucet et al., 1988; Lidow et al., 1991). Berücksichtigt man diese Tatsache, dürften Erkenntnisse über die Dopaminfunktion in einer Hirnregion nicht auf eine andere übertragen werden (Luft und Schwarz, 2009). Um neue Erkenntnisse zu gewinnen, muss das zu untersuchende Hirnareal daher gut abgegrenzt und selektiv stimulierbar sein. In der vorliegenden Arbeit haben wir der Hirnanatomie dadurch Rechnung getragen, dass wir Levodopa und seine Agonisten lokal in die Hirnrindenschicht V des primär motorischen Kortex M1 appliziert haben – die Schicht, die am meisten Dopaminrezeptoren besitzt (Martres et al., 1985; Dawson et al., 1986). Durch die Methodenwahl der lokalen Applikation konnten systemische Dopamineffekte, im Besonderen die Wirkung des Dopamins in der Substantia nigra und den Basalganglien minimiert werden. Dass die gewählte Methode dies ermöglicht, zeigen frühere Arbeiten unserer Gruppe, die den Diffusionsradius von intrakortikal applizierten Testsubstanzen mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) untersucht haben. 20 min nach lokaler Applikation der Substanz in M1 konnte ein Diffusionsradius von 0,5 mm<sup>2</sup> um die Nadelspitze nachgewiesen werden. Sowohl die Ursprungsorte dopaminerger Projektionen im Mittelhirn als auch die Basalganglien liegen außerhalb dieses Diffusionsradius (Molina-Luna, 2004). Daher sollten bei einer lokalen Applikation der Testsubstanzen diese Strukturen nicht beeinflusst werden. Da für die vorliegende Arbeit allerdings eine Dauerinfusion über sieben Trainingstage (der erste Tag ist Baseline ohne Substanzapplikation) und keine Einmalapplikation gewählt wurde, ist eine gewisse Stimulation anderer Hirnareale trotz dieser Voruntersuchung nicht ganz auszuschließen. Der Ort der höchsten Wirkkonzentration lag aber sicher in einem begrenzten Radius um die Nadelspitze.

(2) Der Dopamineffekt ist von der zeitlichen Dynamik der Applikation abhängig. Dies liegt unter anderem am biphasischen Wirkungsprofil des Dopamins. Stimuliert man Pyramidenzellen in der Hirnrindenschicht V im präfrontalen Kortex mit Dopamin, antwortet die Nervenzelle zuerst mit einer D<sub>2</sub>-rezeptorvermittelten, frühzeitigen Unterdrückung von hemmenden, postsynaptischen Ionenströmen. 10 bis 20 min später kommt dann der länger andauernde, D<sub>1</sub>-rezeptorvermittelte Effekt zum Tragen, der zur

---

Stimulation der hemmenden, postsynaptischen Ionenströme führt (Seamans et al., 2001). Eine ähnliche Wirkung konnte bei Nervenzellen im Hippokampus nachgewiesen werden (Gribkoff und Ashe, 1984; Huang und Kandel, 1995). Auf Grund dessen ist der Versuchsaufbau entscheidend dafür, welchen Effekt Dopamin auf die Erregbarkeit von Nervenzellen und damit auf das Verhalten eines Tieres hat. Pyramidenzellen können nach Dopamingabe eine höhere (Ceci et al., 1999; Tseng und O'Donnell, 2004) oder niedrigere (Gulledge und Jaffe, 1998) Erregbarkeit zeigen. Nicht nur der biphasische Charakter, sondern auch der Zeitpunkt und die Zeitdauer der Dopaminausschüttung sind zentral wichtig für dessen Wirkung. Beispiele hierfür sind die Entstehung des Suchtgefühls (Hyman et al., 2006) und der Einfluss des Dopamins auf das Belohnungssystem (Schultz, 1998, 2006). Will man diesen Einfluss für das Lernen nutzen, ist eine pulsatile Dopamingabe, die die richtige Bewegung selektiv mit einer Dopaminausschüttung belohnt, sinnvoll. Schlechte oder falsche Bewegungen werden nicht belohnt. Das richtige Verhalten würde auf diese Weise gelernt werden (vergleiche Abb. 1.1 zur Rolle des Belohnungssystems für die Ausführung einer Bewegung). In der vorliegenden Arbeit wollten wir nun den unmittelbaren Effekt des Dopamins auf das motorische Lernen abbilden. Daher haben wir im Versuchsaufbau die Dauerapplikation des Dopaminvorläufers Levodopa bzw. seiner Rezeptoragonisten festgelegt, um Fehlinterpretationen durch Belohnungseffekte zu minimieren. Eine Dauerapplikation bringt noch weitere Vorteile mit sich. So muss man die Tiere nach einer einmaligen Operation nicht weiteren Kurznarkosen für die Applikation von Testsubstanzen unterziehen. Die Tiere können sich frei im Käfig bewegen, bis der Versuchsleiter sie für das Training aus dem Käfig nimmt. Außerdem kann durch eine Pumpe gewährleistet werden, dass alle Tiere der Studie die gleiche Konzentration der Testsubstanz mit konstanter Pumprate appliziert bekommen. Einzelapplikationen hätten zwangsläufig zu geringen Differenzen in der Injektionsgeschwindigkeit geführt. Die zeitliche Dynamik der Dopaminwirkung- und Ausschüttung wurde damit bewusst vernachlässigt. Die damit erstrebte Ausklammerung des Belohnungssystems ist bei der Bewertung des motorischen Lernfortschrittes allerdings problematisch. Eine Beobachtung, bei der ein vermutlich wichtiger Einfluss ausgeblendet wurde, muss als unphysiologisch angesehen

---

werden. Auch kann eine Dauerapplikation der Agonisten dem biphasischen Charakter der Dopaminwirkung, die zuerst  $D_2$ - und dann  $D_1$ -rezeptorvermittelt ist, nur unzureichend gerecht werden.

Mechanismen wie Habituation, Sensibilisierung und Toleranzentwicklung können überdies stattgefunden haben. Dies kann nur schwer ausgeschlossen oder nachgewiesen werden. Es wurde des Weiteren von Forschungsgruppen beobachtet, dass Stress zu einer tonischen Dopaminausschüttung führt und es dadurch zu einer Verschlechterung der Gedächtnisleistung kommt (Arnsten, 2007; Schultz, 2006). Ob wir durch das Verfahren der Dauerapplikation bei den Tieren eine dem Stress ähnliche Zustandsform erzeugt und damit den Lernprozess eher erschwert haben, kann nicht mit Sicherheit geklärt werden. Die Tiere, die Levodopa appliziert bekamen, wirkten auf den Versuchsleiter allerdings tendenziell nervöser und hektischer als die Kontrolltiere. Als objektive Messgrößen hierfür könnte man die Latenzzeiten für motorische Geschicklichkeit ( $T_{\text{door-pellet}}$ ) und Motivation ( $T_{\text{pellet-door}}$ ) heranziehen. Beide Zeitintervalle sind gegen Ende des Trainings unter Levodopa signifikant kürzer als bei den Kontrolltieren und könnten damit anstatt Performance und Geschicklichkeit die Gestresstheit der Tiere zum Ausdruck bringen. Bei dieser Interpretation bleibt aber zu bedenken, dass das hier zugrunde liegende Lernmodell dafür entwickelt wurde, Lernkurvenverläufe anhand der Erfolgsrate der Tiere abzubilden. Die Latenzzeiten sind sekundäre Zielgrößen, die von unserer Arbeitsgruppe nicht systematisch darauf hin untersucht wurden, was sie abbilden. Sicher ist, dass sich mit ihnen keine einzelnen Zustandsformen getrennt voneinander messen lassen, sondern vielmehr eine Vermischung von mehreren Verhaltenseigenschaften. Damit können sie lediglich als Hilfsgrößen zur Ergebnisinterpretation herangezogen werden.

(3) Der Dopamineffekt ist auch abhängig von der Konzentration des Neurotransmitters (Luft und Schwarz, 2009). Man muss eine optimale Dopamindosis verabreichen, um die Feuerrate von Nervenzellen zu erhöhen. Zu geringe oder zu hohe Dopaminkonzentrationen schwächen die neuronale Erregbarkeit ab (Goldman-Rakic et al., 2000; Vijayraghavan et al., 2007). Die Stimulation des  $D_1$ -Rezeptors in der präfrontalen Hirnrinde von

---

Primaten zeigt eine *in vivo* gemessene Rezeptor-Aktivierungskurve, die mit steigender Agonistenkonzentration eine umgekehrte U-Kurve beschreibt. Bei zu niedrigen wie zu hohen Dosierungen ist der Rezeptor inaktiv und verringert dadurch die kognitive Leistungsfähigkeit (Vijayraghavan et al., 2007). Erklären lässt sich diese Beobachtung mit der Tatsache, dass Dopamin je nach Konzentration eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen Dopaminrezeptoren hat (Zheng et al., 1999). Im präfrontalen Kortex der Ratte wirkt Dopamin in niedrigen Konzentrationen ( $< 50 \mu\text{M}$ ) über den  $D_1$ -Rezeptor, in höheren Konzentrationen über den  $D_2$ -Rezeptor und hat dadurch gegensätzliche Effekte an den Pyramidenzellen (Zheng et al., 1999). Zur Festlegung möglichst optimaler Infusionsmengen von Levodopa und  $D_1$ - und  $D_2$ -Rezeptoragonisten haben wir Dosierungen aus vergleichbaren Versuchsprotokollen (Molina-Luna et al., 2009; Lavin und Grace, 2001; Samson und Chappell, 2003) für unser Experiment übernommen. Die Ko-Applikation der beiden Agonisten stellte dabei eine besondere Herausforderung dar. Will man das dopaminvermittelte Calciumsignal auslösen, muss man beide Agonisten in denselben Konzentrationen applizieren (Lee et al., 2004). Wir haben uns daher dafür entschieden beide Substanzen in einer Konzentration von je  $1 \mu\text{M}$  zu infundieren. Damit war diese Testsubstanz mit  $2 \mu\text{M}$  doppelt so hoch konzentriert wie die Injektionslösungen der einzeln applizierten Agonisten. Es existieren keine Toxizitätsgrenzwerte der Agonisten. Eine toxische Wirkung der Agonisten auf Nervenzellen des Motokortex M1 ist aber durchaus beobachtet worden (Mengia S. Rioult-Pedotti, persönliche Kommunikation) und sollte bei der Ergebnisinterpretation beachtet werden. Bei jeder Ko-Applikation ist zudem eine Interaktion der Substanzen möglich – auf die die Lösung nicht getestet wurde.

(4) Die gewählten Rezeptoragonisten und ihre spezifischen Rezeptorbindungseigenschaften stehen ebenfalls zur Diskussion. Der hier verwendete  $D_1$ -Rezeptoragonist SKF 38393 bindet bereits in niedrigeren Konzentrationen an den  $D_1$ -Rezeptor, als der  $D_2$ -Rezeptoragonist Quinpirol an den  $D_2$ -Rezeptor bindet (Gingrich und Caron, 1993). Quinpirol als reiner  $D_2$ -Agonist bindet dabei nur an den  $D_2$ -Rezeptor. SKF 38393 ist im Gegensatz dazu ein partieller Agonist, der in höheren Konzentrationen neben der  $D_1$ -Rezeptoraffinität auch Affinität zum  $D_2$ -Rezeptor besitzt. Bei einer Mindestkonzentra-

tion von 1 nM sind 50 % der D<sub>1</sub>-Rezeptoren von SKF 38393 besetzt, bei 150 nM sind zusätzlich 50% des D<sub>2</sub>-Rezeptors mit SKF 38393 besetzt (URL: [http://www.tocris.com/literature.php?tc\\_pdf](http://www.tocris.com/literature.php?tc_pdf)). Beim vorliegenden Versuch wurden SKF-Konzentrationen von 1 µM appliziert. Es muss folglich davon ausgegangen werden, dass SKF an beiden Rezeptoren gewirkt hat. Damit ist seine Agonistenwirkung nur schwer beurteilbar, da nicht genau bestimmt werden kann, durch welche Rezeptoraktivierungen der Effekt von SKF 38939 auf den Lernkurvenverlauf zustande kam. Geht man von der Existenz eines D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>-Korezeptors aus, könnte SKF auch diesen aktiviert haben. Wie sich dadurch die Erfolgsrate der Greifversuche ändern würde, wissen wir nicht. Schlussendlich können wir die Wirkung der D<sub>1</sub>-Rezeptoraktivierung auf das Lernen mit Hilfe von SKF 38393 nicht ausreichend untersuchen. Es sind noch andere D<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten im Handel. Experimente von Lee und Mitarbeitern, die zeigen, dass durch Ko-Applikation isomolarer Mengen D<sub>1</sub>- und-D<sub>2</sub>-Agonisten ein Calciumsignal getriggert werden kann, wurden z. B. mit dem D<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten SKF 81297 durchgeführt (Lee et al., 2004). Der Hauptunterschied zwischen den einzelnen D<sub>1</sub>-Agonisten ist ihr unterschiedlicher Wirkmechanismus. SKF 83959 wirkt ausschließlich über die Aktivierung des Enzyms Phospholipase C (triggert das Calciumsignal), SKF 81297 und vermutlich auch das hier verwendete SKF 38939 wirken über die Aktivierung der Enzyme Phospholipase C und Adenylatcyclase (triggern das Calcium- und das cAMP-Signal), SKF 83833 wirkt ausschließlich über die Aktivierung der Adenylatcyclase (triggert das cAMP-Signal; Rashid et al., 2007<sub>b</sub>). Die Wahl anderer D<sub>1</sub>-Agonisten könnte demnach die Interpretation der Effekte des D<sub>1</sub>-Rezeptors (SKF 83833) und des D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>-Korezeptors (SKF 83959) auf das motorische Lernen erleichtern und die Validität der Ergebnisse verbessern.

(5) In der vorliegenden Arbeit haben wir die Hypothese aufgestellt, dass der Dopamin-effekt auf das Lernen durch den D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>-Korezeptor vermittelt sein könnte, dessen Existenz wir postulieren. Die Expression dieses Rezeptors ist vermutlich altersabhängig (Rhasid et al., 2007<sub>a</sub>). Will man diesen Rezeptortyp untersuchen, sollte man mit Tieren arbeiten, die bereits einige Monate alt sind. Um die gleichen Ausgangsbedingungen für alle Tiere zu schaffen, waren die Ratten dieses Experiments am Operationstag mit

---

69 Tagen nahezu gleich alt (69,4 d; SD  $\pm$  6,1 d). Es ist möglich, dass die Tiere noch etwas älter hätten sein müssen, um eine starke Expression des D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>-Korezeptors und damit einen deutlicheren Effekt von Levodopa auf das Lernen zu beobachten.

#### 4.1.2 DAS RATTENMODELL

Das hier verwendete Lernmodell der Ratte wurde von unserer Arbeitsgruppe etabliert, um das motorische Lernen zu untersuchen (Buitrago et al., 2004). Der Fokus liegt auf der Akquisition impliziter, prozeduraler Gedächtnisinhalte und deren motorischer Ausführung. Die primäre Zielgröße hierbei ist die Anzahl der erfolgreichen Greifversuche pro Tag und Tier (Erfolgsrate). Entsprechend dieser Größe können Lernkurven gezeichnet und auf Unterschiede im Verlauf untersucht werden. Sekundäre Zielgrößen sind die Latenzzeiten zwischen Türöffnung und Pelletentfernung ( $T_{\text{door-pellet}}$ ) und zwischen Pelletentfernung und erneuter Türöffnung ( $T_{\text{pellet-door}}$ ). Die Wissenschaft studiert Lernprozesse schon seit Jahrzehnten mit Hilfe von Rattenmodellen (Peterson und Gucker, 1959; Whishaw und Coles, 1996; Metz und Whishaw, 2000). Ratten können in kurzer Zeit verschiedene motorische Fähigkeiten erwerben und pharmakologischen, histologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen unterzogen werden. Dies macht sie zu sehr gut geeigneten Versuchstieren (Buitrago et al., 2004; Molina-Luna, 2004). Durch die Erfahrung aus früheren Experimenten konnten wir auch die Eigenheiten der Tiere bei der Versuchsplanung berücksichtigen. So wissen wir, dass weibliche Ratten schneller lernen als männliche bei gleicher Höhe des Lernplateaus (Buitrago et al., 2004). Die Ursache für den geschlechtsgebundenen Unterschied im Lernkurvenverlauf ist uns nicht bekannt. Man könnte spekulieren, dass weibliche und männliche Tiere verschiedene Herangehensweisen haben, wie sie sich den Zugang zum Futterpellet verschaffen (z. B. olfaktorisch versus visuell gesteuertes Greifen). Weibliche Ratten könnten außerdem eine größere Motivation haben ans Futter zu gelangen. Auf Grund dieser Erkenntnis haben wir uns entschieden, nur männliche Tiere in die Studie aufzunehmen. Deren initialer Lernkurvenanstieg ist flacher und diskrete Gruppenunterschiede können auf diese Weise besser abgebildet werden. Indem wir zudem das Ge-

---

wicht der Tiere über die acht Trainingstage nahezu stabil hielten, ist von einer gleichbleibenden Motivation auszugehen.

Die Stärken des Modells liegen darin, dass es von unserer Arbeitsgruppe gut untersucht wurde und als etabliert gilt. Das Besondere ist, dass wir in der Lage sind, mit den Ratten den Lernkurvenverlauf eines Menschen beim Erlernen einer motorischen Bewegungsabfolge annähernd nachzuzeichnen. Man findet bei den Tieren einen sigmoidalen Lernkurvenverlauf mit einer maximalen Akquisitionsphase zu Beginn des Trainings und der Ausbildung eines Lernplateaus nach wenigen Tagen, ähnlich einer Boltzmann-Funktion. Innerhalb eines Trainings verbessern sich die Tiere. Das Lernmaximum am Ende eines Tages kann zum Teil bis zur nächsten Trainingseinheit aufrecht erhalten werden. Es treten Prozesse von lang anhaltendem Lernen zwischen den einzelnen Lernphasen und von kurz anhaltendem Lernen innerhalb eines Trainings statt. Lässt man einen Menschen eine Bewegungsabfolge erlernen, zeigt sich auch hier eine Phase von schnellem Lernzuwachs zu Beginn des Trainings. Der Lernzuwachs nimmt ähnlich wie bei den Ratten über die Trainingstage hinweg ab, bis nach wenigen Tagen oder Wochen repetitiven Übens ein Lernplateau erreicht wird. Auch für diese Lernkurve könnte man eine Boltzmann-Anpassung vornehmen (Karni et al., 1998; Liu et al., 2003). Mit den Latenzzeiten als sekundäre Zielgrößen hat man noch mehr Instrumente das Lernen zu untersuchen. Die Latenzzeit zwischen der Türöffnung und Pelletentfernung ( $T_{\text{door-pellet}}$ ) gilt als ein Maß für den Lernprozess und die Geschicklichkeit des Tieres. Die Zeitspanne zwischen Pelletentfernung und erneuter Türöffnung ( $T_{\text{pellet-door}}$ ) zeigt an, wie gut das Tier das Türöffnungsprinzip verstanden hat und wie motiviert es ist (Buitrago et al., 2004; Schubring-Giese et al., 2007). Allerdings können Emotionen, Hunger und Stress diese Zeiten beeinflussen und machen sie damit nur eingeschränkt auswertbar. Zu Beginn des Trainings sind  $T_{\text{door-pellet}}$  und  $T_{\text{pellet-door}}$  bei allen Tieren noch relativ lang. Nach dieser initialen Phase werden die Latenzzeiten rasch kürzer, dies könnte man als den Zeitpunkt auffassen, an dem die Tiere das Konzept der Türöffnung verstanden und die motorischen Fähigkeiten erworben haben, um sich mit einem Pellet zu belohnen, die Motivation und Performance steigen. Die Latenzzeiten korrelieren beide signifikant mit der Erfolgsrate der Tiere. Dabei werden die Latenzen mit steigen-

---

der Erfolgsrate kürzer. Betrachtet man die Verläufe der Latenzen genauer, so fällt auf, dass sich die Levodopa-Tiere an einzelnen Tagen gegen Ende des achttägigen Trainings signifikant von den Kontrolltieren unterscheiden. Die Levodopa-Tiere sind schneller. Eine mögliche Interpretation wäre, dass die Levodopa-Tiere eine bessere motorische Performance erworben haben und motivierter sind als die Kontrolltiere. Andererseits könnte auch die kontinuierliche Applikation des Levodopas einen Stresszustand auslösen, der die Tiere schneller und hastiger greifen lässt. Abschließend sei noch angemerkt, dass die Motivationsbeeinflussung der Tiere durch Dopamin in diesem Versuch vermutlich eine untergeordnete Rolle spielt. Denn dessen Einfluss ist dann besonders groß, wenn der Transmitter zusammen mit einer Belohnung pulsatil ausgeschüttet wird (Schultz, 2006). Eine Dauerapplikation kann das Belohnungsgefühl vermutlich nur sehr eingeschränkt auslösen.

Die vermutlich größte Schwäche unseres Modells ist die große biologische Varianz der Lernkurven der einzelnen Tiere – auch innerhalb einer Gruppe. Obwohl alle Tiere am Ende des achttägigen Trainings die Handlungsabfolge gelernt haben, sind die Leistungsunterschiede zum Teil beträchtlich. Gründe dafür können verschiedene Lernstrategien oder unterschiedliche Ausgangsfähigkeiten sein. Unsere Beobachtungen stimmen somit mit denen von Whishaw und Pellis überein. Diese verglichen Videoaufnahmen von Trainingseinheiten einzelner Tiere miteinander und stellten fest, dass die einzelnen motorischen Elemente im Bewegungsablauf der Ratten unter den Tieren nur wenig variieren (Whishaw und Pellis, 1990). Demnach scheinen die unterschiedlichen Ausgangsfähigkeiten die Hauptursachen für den biologischen Bias zu sein. Indem wir gleichaltrige Geschwister aus einem Wurf den verschiedenen Gruppen randomisiert zugeteilt haben, haben wir versucht, in allen Gruppen dieselben Ausgangsbedingungen zu schaffen. Denn trotz der Problematik der unterschiedlichen Ausgangsfähigkeiten bedarf es letztendlich der Mittelung der Lernleistung innerhalb einer Gruppe, um Lernunterschiede zwischen den Gruppen aufzeigen zu können. Bei diesem Vorgehen kann es dann passieren, dass die gemittelte Lernkurve für keines der Tiere innerhalb der Gruppe repräsentativ ist (Buitrago et al., 2004).

Eine weitere Schwäche des Tiermodells ist, dass die Ergebnisse eines Experiments vom Trainer abhängig sind. Jeder Mensch behandelt Tiere anders, belohnt oder bestraft unterschiedliche Verhaltensweisen, hilft beim Erlernen des Bewegungsablaufs auf seine ganz individuelle Art mit. Aus diesem Grund können Daten aus anderen, ähnlichen Experimenten nur bedingt herangezogen werden, um Vergleiche zu ziehen oder Hypothesen zu diskutieren. Es ist aber dennoch anzunehmen, dass die herausgearbeiteten Trends einzelner Versuche auch von anderen Trainern repliziert werden können. Die Ergebnisse dürfen zudem nie losgelöst vom untersuchten motorischen Bewegungsablauf interpretiert werden. Motorische Lernabfolgen sind komplex und beanspruchen je nach Bewegung viele verschiedene Hirnregionen, um erfolgreich ausgeführt werden zu können. Es mag sein, dass neben dem Einfluss auf das motorische Lernen auch andere Verhaltensebenen durch die dopaminerge Modulation mit beeinflusst wurden. Unter anderem um diese Seiteneffekte des Dopamins abzubilden, wurden die Latenzzeiten gemessen. Dabei können Motivation, Aufmerksamkeit, Stress, konzeptionelles und räumliches Denken nicht exakt voneinander abgegrenzt werden. Einer Latenzveränderung kann daher nicht mit Sicherheit eine bestimmte Ursache zugeordnet werden.

## 4.2 HYPOTHESENDISKUSSION

Dopamin ist wichtig für das motorische Lernen. Dies zeigt die Beobachtung, dass die Gabe von Dopamin bei präexistentem Dopamindefizit Lernen wieder ermöglicht (Floel et al., 2005; Molina-Luna et al., 2009). Die Wirkung könnte über LTP-Induktion vermittelt werden (Riout-Pedotti, 2000; Molina-Luna et al., 2009). Ob Dopamin additiv in einer Nicht-Mangelsituation über einen ähnlichen Mechanismus einen lernverbessernenden Effekt hat, bleibt fraglich und konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden. Unsere Arbeitshypothese, die kontinuierliche Infusion von Levodopa verbessere auch das Lernen beim gesunden Tier, ist durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt worden. Weder die Applikation des Dopaminvorläufers Levodopa noch die Agonistenapplikation bewirkten einen signifikant steileren Lernkurvenanstieg im Vergleich mit den Kontrolltieren. Die Unterschiede zwischen den Kontroll- und Levodopa-Tieren sind besonders diskret. Bei der Gruppe, die beide Agonisten simultan appliziert bekam, ist der Lern-

---

kurvenanstieg am Tag zwei signifikant flacher als bei den Kontrolltieren. Die Applikation von Agonisten hat damit vermutlich durchaus Einfluss auf den Lernkurvenverlauf. Zumeist wird das Signifikanzniveau aber nicht erreicht. Die Interpretation der Agonistenkurven ist spekulativ, dies berücksichtigend aber möglich. Bei der Betrachtung der Lernkurven bekommt man den Eindruck, dass mit der Ko-Applikation der beiden Agonisten die Lernkurve der Levodopa-Tiere nicht repliziert werden konnte. Geht man davon aus, dass die Wirkung des Dopamins über den D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>-Korezeptor auf die Zellen übertragen wird, ist es uns mit den verwendeten Agonisten und ihrer Konzentration vermutlich nicht gelungen, den Korezeptor zu stimulieren. Vielleicht wäre uns die Aktivierung durch Verwendung eines anderen D<sub>1</sub>-Agonisten (Rashid et al., 2007<sub>b</sub>), mit anderen Konzentrationsverhältnissen oder durch die Arbeit mit älteren Tieren (Rashid et al., 2007<sub>a</sub>) gelungen. Verglichen mit der Levodopa-Kurve scheint sich die Agonisten-Ko-Applikation negativ auf das Lernen ausgeübt zu haben. Dafür kann es viele Gründe geben. Z. B. könnte die doppelt so hohe Konzentration der Agonisten in der Applikationslösung für den flachen Lernkurvenanstieg verantwortlich sein. Oder die Agonisten heben ihre positive Wirkung auf das Lernen gegenseitig auf, in dem sie über die Aktivierung, bzw. Hemmung der Adenylatcyclase an ihren jeweiligen Rezeptoren antagonistisch wirken. Dass die Aktivierung des D<sub>1</sub>- oder D<sub>2</sub>-Rezeptors unterschiedliche Effekte auf das Lernen hat, kann man bei der Betrachtung der Lernkurven dieser Gruppen vermuten. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Beurteilung, ob sich eine additive Dopamingabe beim Gesunden positiv auf das Lernen auswirkt, ist der Einfluss des Dopamins auf das Belohnungssystem. Besonders in der Akquisitionsphase eines motorischen Tasks scheint das dopaminerge System wichtig zu sein (Hernandez et al., 2005). Da in der vorliegenden Arbeit eine kontinuierliche Infusion von Levodopa bzw. seiner Agonisten gewählt wurde, konnte der belohnende Effekt des Dopamins durch pulsatile Gabe nicht genutzt werden. Diese Tatsache kann die Lernkurven in unphysiologischer Weise verändert haben. In zukünftigen Arbeiten sollte der zeitliche Aspekt der Dopaminapplikation mehr im Mittelpunkt stehen. So zeigt eine ganz aktuelle Studie an der gesunden Ratte, dass die einmalige Gabe des Dopaminvorläufers Levodopa

---

30 min vor jeder Trainingseinheit das motorische Lernen beschleunigt (A. Luft, persönliche Kommunikation).

Anhand der Latenzen kann gezeigt werden, dass es falsch wäre zu behaupten, Dopamin habe keinen Einfluss auf das Lernen der gesunden Ratte. Es lässt sich nicht sicher sagen, wodurch die Latenzzeitunterscheide zwischen den Kontrolltieren und den Levodopa-Tieren zustande kommen. Ob Dopamin bei kontinuierlicher Applikation die Tiere unter Stress setzt, sollte in weiteren Untersuchungen abgeklärt und ggf. bei zukünftigen Experimenten berücksichtigt werden.

### 4.3 AUSBLICK

Auf Grund der derzeitigen Datenlage wird klar, dass es noch vieler Untersuchungen bedarf um die Funktion des Dopamins für das motorische Lernen in M1 widerspruchsfrei zu klären. Seine wichtige Rolle steht dabei außer Frage. Die Tatsache, dass die dopaminergen Projektionen im M1 des Menschen noch stärker sind als beim Tier, könnte sogar Zeichen dafür sein, dass diese Projektionen im Laufe der Entwicklung des Gehirns an Bedeutung gewonnen haben (Luft und Schwarz, 2009). Bei Primaten enden dopaminerge Nervenendigungen in oberflächlichen Hirnrindenschichten, in denen auch kortiko-kortikale Nervenfasern enden, die für das motorische Lernen wichtig sind (Iriki et al., 1991; Rioult-Pedotti et al., 1998). Was das dopaminerge Signal auslöst, ist noch unklar, eventuell ist es ein Belohnungsstimulus nach einer erfolgreichen Bewegung, analog zum Dopaminsignal im präfrontalen Kortex (Schultz, 2006).

Zahlreiche Beobachtungen am Menschen zeigen, wie wichtig es ist, mehr über das dopaminerge System in M1 zu erfahren. Wenn Menschen einen motorischen Ablauf lernen, korreliert die Konzentration von Dopaminabbauprodukten im Liquor mit der Lernrate (McEntee et al, 1987). Verabreicht man Schlaganfallpatienten dopaminhaltige Pharmaka, verbessert sich ihr motorisches Lernen (Scheidtmann et al., 2001; Floel et al., 2005). Nimmt man an, dass motorisches Neulernen und motorische Erholung nach Schlaganfall den gleichen Mechanismen folgen, könnten Dopamin und die Nutzung des Belohnungssystems Schlüsselrollen für erfolgreiche Neurorehabilitation spielen (Luft

und Schwarz, 2009). Der Beitrag des Motokortex zu einer erfolgreichen Neurorehabilitation von Schlaganfallpatienten ist noch unklar. Im Verständnis seiner Funktion könnte ein großes Potential liegen, solchen Patienten in Zukunft besser helfen zu können. Außerdem könnten die dopaminergen Projektionen in M1 auch eine Rolle bei der Entstehung der Symptome des M. Parkinson einnehmen (Berger et al., 1986). Wenn man bedenkt, dass diese Projektionen bereits in der frühen Phase der Erkrankung degenerieren (Moore et al., 2008), hat man mit der Dopaminfunktion in M1 ein Erklärungsmodell für die frühen, prozeduralen Lerndefizite der Parkinsonpatienten. Der motorische Kortex sollte in Zukunft noch genauer auf seine Rolle bei der Entstehung des M. Parkinson untersucht werden. Nur auf diese Weise können solche Erklärungsmodelle überprüft werden und das bessere Verständnis der Pathophysiologie dazu beitragen, diese häufige Erkrankung besser zu verstehen und besser behandeln zu können.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das menschliche Gehirn hat ein enormes Potential zur Plastizität. Die physiologischen Grundlagen dieser neuronalen Anpassungsfähigkeit sind noch weitgehend unverstanden. In der vorliegenden tierexperimentellen Studie haben wir untersucht, ob es gelingt, die Plastizität –im Sinne einer Lernverbesserung – gezielt zu beeinflussen. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Dopamin bei präexistentem Dopamindefizit motorisches Lernen verbessert (Floel et al., 2005; Molina-Luna et al., 2009). Wir stellten die Hypothese auf, dass eine kontinuierliche Dopamininfusion auch beim gesunden Tier das motorische Lernen beschleunigen kann. Um dies zu prüfen, haben wir gesunden Ratten während eines motorischen Lernvorganges den Dopaminvorläufer Levodopa oder die Dopaminagonisten SKF 38393 und Quinpirol lokal, in den motorischen Kortex M1 appliziert.

Mittels unseres speziell entwickelten Lernmodells der Ratte waren wir in der Lage, den Einfluss der Testsubstanzen auf das Lernen zu quantifizieren. Das Lernmodell war so konzipiert, dass die Lernkurve eines Menschen während des Erlernens einer motorischen Bewegungsabfolge durch die Lernkurve der Ratte annähernd nachgebildet werden konnte. Die große interindividuelle Varianz der Lernkurven, die in den unterschiedlichen Ausgangsfähigkeiten der Tiere begründet liegt, muss bei der Interpretation der Ergebnisse ebenso bedacht werden wie die individuelle Art des Trainers, die Tiere beim Erlernen des Bewegungsablaufs zu unterstützen. Die Ergebnisse dürfen zudem nie losgelöst vom untersuchten motorischen Bewegungsablauf interpretiert werden, da je nach Bewegungsablauf unterschiedliche Hirnregionen mit aktiviert werden, um die Bewegung erfolgreich auszuführen.

Mit unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das motorische Lernen der gesunden Ratte durch eine lokale, kontinuierliche Levodopa-Applikation oder durch eine kontinuierliche Applikation der Dopaminagonisten nicht verbessern lässt. Ein positiver Dopamineffekt unter anderen Versuchsbedingungen ist nach neusten Studien unserer Arbeitsgruppe allerdings anzunehmen. Nach einmaliger, lokaler Applikation des Do-

paminvorläufers Levodopa in den motorischen Kortex M1 der Ratte 30 min vor jeder Trainingseinheit und einem Training über acht Tage, ist eine signifikante Verbesserung des motorischen Lernens zu beobachten (A. Luft, persönliche Kommunikation).

Der Neurotransmitter Dopamin hat viele besondere Eigenschaften, die Einfluss auf seine Wirkung nehmen. Der Dopamineffekt ist abhängig von der Zytoarchitektur der Hirnrindenschicht, in die der Transmitter appliziert wird (Descarries et al., 1987; Doucet et al., 1988; Lidow et al., 1991), von der zeitlichen Dynamik der Applikation (Hyman et al., 2006; Schultz, 1998, 2006), von seiner Konzentration (Luft und Schwarz., 2009) und vermutlich auch vom Alter der in der Studie eingeschlossenen Tiere (Rhasid et al., 2007<sub>a</sub>).

Die kontinuierliche Applikation der Dopaminagonisten SKF 38393 und Quinpirol erbrachte auch keine Lernvorteile gegenüber den Kontrolltieren. In unserer Hypothese postulierten wir die Existenz eines D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>-Korezeptors, über welchen die Wirkung des Dopamins auf das motorische Lernen vermittelt werden sollte. Mit der Ko-Applikation beider Agonisten hätte es uns dann möglich sein sollen, die Lernkurve der Levodopa-Tiere nachzuzeichnen. Die Levodopa-Kurve konnte allerdings durch die Ko-Applikation nicht repliziert werden. Gründe hierfür können die spezifischen Rezeptoreigenschaften der ausgewählten Agonisten sein oder eine vermutete altersabhängige Expression des Korezeptors (Rhasid et al., 2007<sub>a</sub>). Möglicherweise waren die hier trainierten Tiere für eine ausreichende Expression zu jung.

Der Neurotransmitter Dopamin ist in zahlreiche Lern- und Gedächtnisprozesse involviert (El-Ghundi et al., 2007). Eine wichtige Rolle für die neuronale Plastizität während eines motorischen Lernvorgangs ist anzunehmen (Hosp et al., 2009; Molina-Luna et al., 2009). Doch abschließend muss trotz aller bereits erbrachten Erkenntnisse eingeräumt werden, dass das Verständnis der physiologischen Vorgänge während eines Lernvorgangs vermutlich noch nicht ausreichend verstanden sind, um in diese Prozesse bereits modulatorisch eingreifen zu können. Weitere Grundlagenforschung ist nötig, um die Mechanismen besser zu verstehen, die wir letztendlich beeinflussen wollen. Dann könnte eine gezielte Steuerung von neuronaler Plastizität möglich werden. Dieser

Schritt würde uns eine neue Dimension zur Therapie sämtlicher Erkrankungen aufzeigen, die einer neuronalen Regeneration bedürfen. Beispiele hierfür sind ischämische Hirnerkrankungen, wie Schlaganfall und bestimmte Demenzformen oder die Parkinsonsche Krankheit. Mit diesem Ziel vor Augen scheint weitere Forschung auf diesem Gebiet höchst lohnenswert.

## 6 ANHANG

### 6.1 ERKLÄRUNG ZUR TIERHALTUNG

Während meiner Versuche habe ich alle Anstrengungen unternommen, ein unnötiges Leid der Tiere zu vermeiden. Ich habe mich intensiv darum bemüht, dass die Tiere die bestmögliche Versorgung erhalten haben. Um tierschutz- und versuchstierkundliche Fachkenntnisse zu erlangen, habe ich am versuchstierkundlichen Privatissimum des Tierärztlichen Dienstes der Universität Tübingen teilgenommen. Alle Handlungen am Tier wurden vom Tierärztlichen Dienst der Universitäten Tübingen und Zürich überwacht.

An dieser Stelle soll betont werden, dass wir nur durch Tierexperimente dazu in der Lage sind, Grundlagenforschung auf hohem Niveau zu betreiben. Den Tieren gebührt dabei unser aller Respekt.

### 6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Modell der motorische Kontrolle (modifiziert nach Hikosaka et al., 1999) .....	1
Abbildung 1.2: Lernkurve beim Erlernen einer neuen Bewegungsabfolge (Motor skill learning curve; modifiziert nach Luft und Buitrago, 2005).....	4
Abbildung 1.3: Synaptische Übertragung durch Dopamin (nach Aktories et al., 2005) ..	6
Abbildung 1.4: Mögliche Formen von $G_{q/11}$ -gekoppelten Dopaminrezeptoren (modifiziert nach Rashid et al., 2007 <sub>b</sub> ).....	8
Abbildung 2.1: Plexiglaskasten mit Priming- und Trainingskammer, Außenansicht.....	12
Abbildung 2.2: Primingkammer und Trainingskammer, Blick von oben.....	13
Abbildung 2.3: Abfolge der Primings- und Trainingsphasen (Striche stehen für Tage) .	14

Abbildung 2.4: Bewegungssequenz der Trainingsphase .....	16
Abbildung 2.5: Pumpengehäuse (modifiziert nach Theeuwes und Yum, 1976) .....	18
Abbildung 2.6: Infusionssystem.....	18
Abbildung 2.7: Operationssetting und -verfahren .....	21
Abbildung 2.8: Lokalisation der Kanüle im M1-Areal des motorischen Kortex der Ratte .....	24
Abbildung 3.1: Lernkurven der fünf Versuchstiergruppen .....	27
Abbildung 3.2: $\pm 95$ %-Konfidenzintervalle der Mittelwerte der erfolgreichen Greifversuche pro Tag.....	28
Abbildung 3.3: Latenzzeiten $T_{\text{door-pellet}}$ der fünf Versuchstiergruppen .....	30
Abbildung 3.4: $\pm 95$ %-Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Latenzzeiten $T_{\text{door-pellet}}$ pro Trainingstag .....	31
Abbildung 3.5: Negative Korrelation von erfolgreichen Greifversuchen und den Latenzzeiten $T_{\text{door-pellet}}$ .....	32
Abbildung 3.6: Latenzzeiten $T_{\text{pellet-door}}$ der fünf Versuchstiergruppen .....	33
Abbildung 3.7: $\pm 95$ %-Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Latenzzeiten $T_{\text{pellet-door}}$ pro Trainingstag .....	34
Abbildung 3.8: Negative Korrelation von erfolgreichen Greifversuchen und Latenzzeiten $T_{\text{pellet-door}}$ .....	35

### 6.3 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Versuchstiergruppen-Übersicht.....	19
---	----

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2005): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier GmbH, München. 9. Auflage, Seiten 127-130.
- Ariano MA, Fisher RS, Smyk-Randall E, Sibley DR, Levine MS (1993): D2 dopamine receptor distribution in the rodent CNS using anti-peptide antisera. *Brain Res* 609: 71-80.
- Arnsten AF (2007): Catecholamine and second messenger influences on prefrontal cortical networks of "representational knowledge": a rational bridge between genetics and the symptoms of mental illness. *Cereb Cortex* 17: i6-15. Review.
- Awenowicz PW, Porter LL (2002): Local application of dopamine inhibits pyramidal tract neuron activity in the rodent motor cortex. *J Neurophysiol* 88: 3439-3451.
- Berger B, Trottier S, Gaspar P, Verney C, Alvarez C (1986): Major dopamine innervation of the cortical motor areas in the cynomolgus monkey. A radioautographic study with comparative assessment of serotonergic afferents. *Neurosci Lett* 72: 121-127.
- Bouthenet ML, Martres MP, Sales N, Schwartz JC (1987): A detailed mapping of dopamine D-2 receptors in rat central nervous system by autoradiography with [125I]iodosulpride. *Neuroscience* 20: 117-155.
- Buitrago MM (2005): Cortical Mechanisms of motor learning: behavioral, molecular and electrophysiological studies. A Cumulative Thesis.
- Buitrago MM, Ringer T, Schulz JB, Dichgans J, Luft AR (2004): Characterization of motor skill and instrumental learning time scales in a skilled reaching task in rat. *Behav Brain Res* 155: 249-256.
- Ceci A, Brambilla A, Duranti P, Grauert M, Grippa N, Borsini F (1999) Effect of antipsychotic drugs and selective dopaminergic antagonists on dopamine-induced facilitatory activity in prelimbic cortical pyramidal neurons. An in vitro study. *Neuroscience* 93: 107-115.
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK (1993): Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 281-307. Review.
- Conner JM, Culbertson A, Packowski C, Chiba AA, Tuszynski MH (2003): Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning. *Neuron* 38: 819-829.

- Daniel DG, Weinberger DR, Jones DW, Zigun JR, Coppola R, Handel S, Bigelow LB, Goldberg TE, Berman KF, Kleinman JE (1991): The effect of amphetamine on regional cerebral blood flow during cognitive activation in schizophrenia. *J Neurosci* 11: 1907-1917.
- Dawson TM, Gehlert DR, McCabe RT, Barnett A, Wamsley JK (1986): D-1 dopamine receptors in the rat brain: a quantitative autoradiographic analysis. *J Neurosci* 6: 2352-2365.
- Del Arco A, Mora F (2008): Prefrontal cortex-nucleus accumbens interaction: in vivo modulation by dopamine and glutamate in the prefrontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 90: 226-235.
- Descarries L, Lemay B, Doucet G, Berger B (1987): Regional and laminar density of the dopamine innervation in adult rat cerebral cortex. *Neuroscience* 21: 807-824.
- Doucet G, Descarries L, Audet MA, Garcia S, Berger B (1988): Radioautographic method for quantifying regional monoamine innervations in the rat brain. Application to the cerebral cortex. *Brain Res* 441: 233-259.
- El-Ghundi M, O'Dowd BF, George SR (2007): Insights into the role of dopamine receptor systems in learning and memory. *Rev Neurosci* 18: 37-66. Review.
- Floel A, Hummel F, Breitenstein C, Knecht S, Cohen LG (2005): Dopaminergic effects on encoding of a motor memory in chronic stroke. *Neurology* 65: 472-474.
- Floresco SB, Magyar O (2006): Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology (Berl)* 188: 567-585. Review.
- Gingrich JA, Caron MG (1993): Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16: 299-321. Review.
- Goldman-Rakic PS, Muly EC 3rd, Williams GV (2000): D(1) receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res* 31: 295-301. Review.
- Gribkoff VK, Ashe JH (1984): Modulation by dopamine of population responses and cell membrane properties of hippocampal CA1 neurons in vitro. *Brain Res* 292: 327-338.
- Gulledge AT, Jaffe DB (1998): Dopamine decreases the excitability of layer V pyramidal cells in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci* 18: 9139-9151.
- Harms KJ, Rioult-Pedotti MS, Carter DR, Dunaevsky A (2008): Transient spine expansion and learning-induced plasticity in layer 1 primary motor cortex. *J Neurosci* 28: 5686-5690.
- Heijtz RD, Kolb B, Forssberg H (2007): Motor inhibitory role of dopamine D1 receptors: implications for ADHD. *Physiol Behav* 92: 155-160.

- Hernandez PJ, Andrzejewski ME, Sadeghian K, Panksepp JB, Kelley AE (2005): AM-PA/kainate, NMDA, and dopamine D1 receptor function in the nucleus accumbens core: a context-limited role in the encoding and consolidation of instrumental memory. *Learn Mem* 12: 285-295.
- Hikosaka O, Nakahara H, Rand MK, Sakai K, Lu X, Nakamura K, Miyachi S, Doya K (1999): Parallel neural networks for learning sequential procedures. *Trends Neurosci* 22: 464-471. Review.
- Hosp JA, Molina-Luna K, Hertler B, Atiemo CO, Luft AR (2009): Dopaminergic modulation of motor maps in rat motor cortex: an in vivo study. *Neuroscience* 159: 692-700.
- Huang YY, Kandel ER (1995): D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2446-2450.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006): Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29: 565-598. Review.
- Iriki A, Pavlides C, Keller A, Asanuma H (1991): Long-term potentiation of thalamic input to the motor cortex induced by coactivation of thalamocortical and corticocortical afferents. *J Neurophysiol* 65: 1435-1441.
- Karni A, Meyer G, Rey-Hipolito C, Jezard P, Adams MM, Turner R, Ungerleider LG (1998): The acquisition of skilled motor performance: fast and slow experience-driven changes in primary motor cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 861-868. Review.
- Kebabian JW, Calne DB (1979): Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93-96. Review.
- Kuo MF, Paulus W, Nitsche MA (2008): Boosting focally-induced brain plasticity by dopamine. *Cereb Cortex* 18: 648-651.
- Lange KW, Robbins TW, Marsden CD, James M, Owen AM, Paul GM (1992): L-dopa withdrawal in Parkinson's disease selectively impairs cognitive performance in tests sensitive to frontal lobe dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 107: 394-404.
- Lavin A, Grace AA (2001): Stimulation of D1-type dopamine receptors enhances excitability in prefrontal cortical pyramidal neurons in a state-dependent manner. *Neuroscience* 104: 335-346.
- Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lança AJ, O'Dowd BF, George SR (2004): Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* 279: 35671-35678.

- Lidow MS, Goldman-Rakic PS, Gallager DW, Rakic P (1991): Distribution of dopaminergic receptors in the primate cerebral cortex: quantitative autoradiographic analysis using [3H]raclopride, [3H]spiperone and [3H]SCH23390. *Neuroscience* 40: 657-671.
- Liu YT, Mayer-Kress G, Newell KM (2003): Beyond curve fitting: a dynamical systems account of exponential learning in a discrete timing task. *J Mot Behav* 35: 197-207.
- Luft AR, Buitrago MM (2005): Stages of motor skill learning. *Mol Neurobiol* 32: 205-216. Review.
- Luft AR, Buitrago MM, Kaelin-Lang A, Dichgans J, Schulz JB (2004): Protein synthesis inhibition blocks consolidation of an acrobatic motor skill. *Learn Mem* 11: 379-382.
- Luft AR, Schwarz S (2009): Dopaminergic signals in primary motor cortex. *Int J Dev Neurosci* 27: 415-421.
- Martres MP, Bouthenet ML, Sales N, Sokoloff P, Schwartz JC (1985): Widespread distribution of brain dopamine receptors evidenced with [125I]iodosulpride, a highly selective ligand. *Science* 228: 752-755.
- McEntee WJ, Mair RG, Langlais PJ (1987): Neurochemical specificity of learning: dopamine and motor learning. *Yale J Biol Med* 60: 187-193.
- Metz GA, Whishaw IQ (2000): Skilled reaching an action pattern: stability in rat (*Rattus norvegicus*) grasping movements as a function of changing food pellet size. *Behav Brain Res* 116: 111-122.
- Molina-Luna K (2004): Cortical dopaminergic transmission and motor learning: Studies in an rodent motor learning model. A Cumulative Thesis.
- Molina-Luna K, Hertler B, Buitrago MM, Luft AR (2008): Motor learning transiently changes cortical somatotopy. *Neuroimage* 40: 1748-1754.
- Molina-Luna K, Pekanovic A, Röhrich S, Hertler B, Schubring-Giese M, Rioult-Pedotti MS, Luft AR (2009): Dopamine in motor cortex is necessary for skill learning and synaptic plasticity. *PLoS One* 4: e7082.
- Moore RY, Whone AL, Brooks DJ (2008): Extrastriatal monoamine neuron function in Parkinson's disease: an 18F-dopa PET study. *Neurobiol Dis* 29: 381-390.
- Nagai T, Takuma K, Kamei H, Ito Y, Nakamichi N, Ibi D, Nakanishi Y, Murai M, Mizoguchi H, Nabeshima T, Yamada K (2007): Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex. *Learn Mem* 14: 117-125.
- Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, Sievert CF, Terreberry RR (1986): The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res* 396: 77-96.

- Onali P, Olianas MC, Gessa GL (1984): Selective blockade of dopamine D-1 receptors by SCH 23390 discloses striatal dopamine D-2 receptors mediating the inhibition of adenylate cyclase in rats. *Eur J Pharmacol* 99:127-128.
- Pekanovic A et al., in Vorbereitung.
- Peterson GM, Gucker DK (1959): Factors influencing identification of the handedness area in the cerebral cortex of the rat. *J Comp Physiol Psychol* 52: 279-283.
- Pollack A (2004): Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors: in marriage, a case of his, hers, and theirs. *Sci STKE* 255: pe50. Review.
- Rashid AJ, O'Dowd BF, Verma V, George SR (2007<sub>b</sub>): Neuronal Gq/11-coupled dopamine receptors: an uncharted role for dopamine. *Trends Pharmacol Sci* 28: 551-555.
- Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF, George SR (2007<sub>a</sub>): D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 654-659.
- Rioult-Pedotti MS, Friedman D, Donoghue JP (2000): Learning-induced LTP in neocortex. *Science* 290: 533-536.
- Rioult-Pedotti MS, Friedman D, Hess G, Donoghue JP (1998): Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat Neurosci* 1: 230-234.
- Samson HH, Chappell A (2003): Dopaminergic involvement in medial prefrontal cortex and core of the nucleus accumbens in the regulation of ethanol self-administration: a dual-site microinjection study in the rat. *Physiol Behav* 79: 581-590.
- Sanes JN, Donoghue JP (2000): Plasticity and primary motor cortex. *Annu Rev Neurosci* 23: 393-415. Review.
- Scheidtmann K, Fries W, Müller F, Koenig E (2001): Effect of levodopa in combination with physiotherapy on functional motor recovery after stroke: a prospective, randomised, double-blind study. *Lancet* 358: 787-790.
- Schubring-Giese M, Molina-Luna K, Hertler B, Buitrago MM, Hanley DF, Luft AR (2007): Speed of motor re-learning after experimental stroke depends on prior skill. *Exp Brain Res* 181: 359-365.
- Schultz W (1998): Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80: 1-27. Review.
- Schultz W (2006): Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annu Rev Psychol* 57: 87-115. Review.

- Seamans JK, Gorelova N, Durstewitz D, Yang CR (2001): Bidirectional dopamine modulation of GABAergic inhibition in prefrontal cortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 21: 3628-3638.
- Seamans JK, Yang CR (2004): The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol* 74: 1-58.
- Theeuwes F, Yum SI (1976): Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Ann Biomed Eng* 4: 343-353.
- Tseng KY, O'Donnell P (2004): Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. *J Neurosci* 24: 5131-5139.
- Undie AS, Weinstock J, Sarau HM, Friedman E (1994): Evidence for a distinct D1-like dopamine receptor that couples to activation of phosphoinositide metabolism in brain. *J Neurochem* 62: 2045-2048.
- Vijayraghavan S, Wang M, Birnbaum SG, Williams GV, Arnsten AF (2007): Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. *Nat Neurosci* 10: 376-384.
- Vincent SL, Khan Y, Benes FM (1995): Cellular colocalization of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *Synapse* 19: 112-120.
- Whishaw IQ, Coles BL (1996): Varieties of paw and digit movement during spontaneous food handling in rats: postures, bimanual coordination, preferences, and the effect of forelimb cortex lesions. *Behav Brain Res* 77: 135-148.
- Whishaw IQ, Pellis SM (1990): The structure of skilled forelimb reaching in the rat: a proximally driven movement with a single distal rotatory component. *Behav Brain Res* 41: 49-59.
- Williams SM, Goldman-Rakic PS (1993): Characterization of the dopaminergic innervation of the primate frontal cortex using a dopamine-specific antibody. *Cereb Cortex* 3: 199-222.
- Zheng P, Zhang XX, Bunney BS, Shi WX (1999): Opposite modulation of cortical N-methyl-D-aspartate receptor-mediated responses by low and high concentrations of dopamine. *Neuroscience* 91: 527-535.
- Tocris Bioscience: Life Science Catalog 2009-2010. *Online-Katalog*: Seite 389.- URL: [http://www.tocris.com/literature.php?tc\\_pdf](http://www.tocris.com/literature.php?tc_pdf) (PDF-file) [Stand 08-2010].

## DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas Luft für die vertrauensvolle Überlassung des Themas bedanken. Trotz seiner vielen Aufgaben konnte ich jedes Anliegen an ihn herantragen und er half mir immer zügig weiter. Ein großer Dank geht auch an meine Betreuerin Dr. rer. nat. Ana Pekanovic, die mich bei meinen Experimenten anleitete. Ein großer Dank weiterhin an unseren Medizinisch-technischen Assistenten Clement Osei Atiemo, der mich unter anderem den Umgang mit den Tieren lehrte. Ich danke dem ganzen Laborteam AG-Luft für die freundschaftliche und fruchtbare Atmosphäre. Ein weiterer besonderer Dank gilt Dipl. biol. Nicole Kieper aus dem Nachbarlabor, die mir als Naturwissenschaftlerin und im Besonderen als Freundin mit jeder Menge guter Tipps und praktischem Einsatz zur Seite stand.

Großer Dank gebührt auch der zeitintensiven Arbeit von Prof. Dr. Dietz, ehem. Geschäftsführender Direktor des Instituts für Medizinische Biometrie der Eberhard Karls Universität Tübingen. Mit seiner Hilfe war eine sehr professionelle und umfassende Analyse meiner Daten möglich.

Daneben danke ich allen Mitarbeiterinnen, Mitarbeitern und Technikern der Laboratorien des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung in Tübingen für ihre Unterstützung und ihr Entgegenkommen.

Ein Dank gebührt auch meinem Stipendiengeber – dem Cusanuswerk. Im Besonderen hat sein ehemaliger geistlicher Rektor Dr. Rainer Hagencord zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Vielen Dank meinen Eltern und allen Freunden für ihre liebevolle Unterstützung.

**LEBENS LAUF VON STEPHANIE FRIDA SOPHIE HEIM****PERSÖNLICHE DATEN**

Geburtsdatum	13.08.1983
Geburtsort	Aalen, Baden-Württemberg

**SCHULAUSSBILDUNG**

1990–1994	Grundschule: Vasenschule Abtsgmünd
1994–2003	Gymnasium: Kopernikusgymnasium Wasseralfingen, Abschluss: Abitur
1999	Schüleraustausch nach Johannesburg und Kapstadt, Südafrika

**BERUF/STUDIUM**

2003–2004	Berufsschule: Kerschensteinerschule Stuttgart abgebrochene Berufsausbildung zur Orthopädietechnikerin
2004–2010	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
22.03.2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
23.11.2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**FAMULATUREN**

2006	Innere Medizin, Zentrum für Innere Medizin, Klinikum Schwä- bisch Gmünd
2007	Gerontopsychiatrie: Tagesklinik Wielandshöhe der Universitäts- klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Tübingen

- 2008 Chirurgie: Cebu Doctors' University Hospital, Cebu, Philippinen  
Gynäkologie und Geburtshilfe: Cebu Doctors' University Hospital, Cebu, Philippinen
- 2009 Neurologie, Schwerpunkt Neurodegenerative Erkrankungen: Neurologische Universitätsklinik Tübingen

#### PJ-TERTIALE

- 8/2009–11/2009 Innere Medizin: Kantonsspital Winterthur, Schweiz
- 12/2009–2/2010 Chirurgie: Leber- und Nierentransplantationsstation, Sir Charles Gairdner Hospital, Perth, Western Australia  
Chirurgie: Plastische- und Rekonstruktionschirurgie, Sir Charles Gairdner Hospital, Perth, Western Australia
- 2/2010–4/2010 Chirurgie: Unfallchirurgie, BG-Unfallklinik Tübingen
- 5/2010–7/2010 Anästhesie: Anästhesiologische Abteilungen der Frauenklinik, Intensivstation und HNO des Universitätsklinikums Tübingen

#### STIPENDIUM

- 4/2006 Stipendiatin des *Cusanuswerks* - *Bischöfliche Studienförderung*

#### DISSERTATION

- 2007–2010 Promotionsarbeit an der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. med. Andreas Luft