

# **Immunhistochemische und neurochemische Untersuchungen zur Rolle von Dopamin im Globus pallidus der Ratte**

*Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften  
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung*

Vorgelegt von

**Holger Fuchs**

aus Gengenbach

Hauptberichter: Prof. Dr. Wolfgang Hauber  
Mitberichterin: Prof. Dr. Franziska Wollnik

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Oktober 2002

Biologisches Institut der Universität Stuttgart  
Abteilung Tierphysiologie



---

für Simon

*Alles Wissen und alles  
Vermehren unseres Wissens  
endet nicht mit einem Schlußpunkt,  
sondern mit einem Fragezeichen.*

*Hermann Hesse*

# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1. INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>4</b>
<b>2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>6</b>
<b>3. SUMMARY .....</b>	<b>7</b>
<b>4. EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
4.1. BASALGANGLIEN.....	9
4.1.1. <i>Anatomie und Neurotransmitter.....</i>	9
4.1.2. <i>Funktionen.....</i>	12
4.1.3. <i>Dopaminerge Systeme .....</i>	13
4.1.4. <i>Rolle des Dopamins in den Basalganglien.....</i>	17
4.1.5. <i>Erkrankungen der Basalganglien.....</i>	18
4.2. GLOBUS PALLIDUS DER RATTE .....	20
4.2.1. <i>Cytoarchitektur.....</i>	21
4.2.2. <i>Afferenzen und Efferenzen.....</i>	22
4.2.3. <i>Dopaminerge Innervation des Globus pallidus .....</i>	25
4.3. DOPAMIN: BIOCHEMIE UND PHYSIOLOGIE.....	34
4.3.1. <i>Anabolismus .....</i>	34
4.3.2. <i>Katabolismus.....</i>	34
4.3.3. <i>Dopamin-Rezeptoren.....</i>	35
4.3.4. <i>Dopaminerge Terminale .....</i>	36
4.3.5. <i>Pharmaka zur Untersuchung dopaminerger Terminalen.....</i>	38
4.4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	39
4.5. METHODIK.....	42
4.5.1. <i>Mikrodialyse.....</i>	42
4.5.2. <i>Welchen Aspekt der Neurotransmission misst die Mikrodialyse ? .....</i>	43
4.5.3. <i>Leistungsfähigkeit und Grenzen der Mikrodialyse.....</i>	44
4.5.4. <i>Analytik mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....</i>	46

<b>5. DURCHGEFÜHRTE ARBEITEN .....</b>	<b>48</b>
5.1. DOPAMINERGIC INNERVATION OF THE RAT GLOBUS PALLIDUS CHARACTERIZED BY IN VIVOMICRODIALYSIS AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY .....	49
5.2. EFFECTS OF PHYSIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL STIMULI ON DOPAMINE RELEASE IN THE RAT GLOBUS PALLIDUS .....	73
5.3. INCREASED EXTRACELLULAR DOPAMINE AFTER REVERSE MICRODIALYSIS OF NMDA AND AMPA IN THE RAT GLOBUS PALLIDUS .....	94
5.4. CHANGES IN EXTRACELLULAR DOPAMINE IN THE RAT GLOBUS PALLIDUS INDUCED BY TYPICAL AND ATYPICAL ANTIPSYCHOTIC DRUGS.....	103
5.5. METHODISCHE ANMERKUNGEN .....	121
5.5.1. <i>Mikrodialyse</i> .....	121
5.5.2. <i>Analytik</i> .....	131
<b>6. ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION.....</b>	<b>137</b>
6.1. HERKUNFT PALLIDALEN DOPAMINS .....	137
6.2. FREISETZUNG PALLIDALEN DOPAMINS .....	137
6.3. REGULATION PALLIDALEN DOPAMINS DURCH GLUTAMAT.....	138
6.4. REGULATION PALLIDALEN DOPAMINS DURCH GABA.....	139
6.5. REGULATION PALLIDALEN DOPAMINS DURCH ACETYLCHOLIN ? .....	141
6.6. WIRKUNG PHYSIOLOGISCHER STIMULI AUF PALLIDALES DOPAMIN.....	142
6.7. WIRKUNG PHARMAKOLOGISCHER STIMULI AUF PALLIDALES DOPAMIN .....	142
6.8. WIRKUNG VON NEUROLEPTIKA AUF PALLIDALES DOPAMIN.....	143
6.9. EINFLUSS VON NOMIFENSIN AUF DIE STIMULUS-INDUZIERTER DOPAMIN-FREISETZUNG IM GLOBUS PALLIDUS .....	144
6.10. MÖGLICHE MIKRODIALYSE-FOLGEEEXPERIMENTE .....	145
6.11. SCHLUSSFOLGERUNG.....	145
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>146</b>
<b>8. ANHANG .....</b>	<b>156</b>
<b>9. DANKSAGUNG .....</b>	<b>159</b>
<b>10. LEBENS LAUF .....</b>	<b>161</b>

## 2. Abkürzungsverzeichnis

GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
AMPA	(S)- $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
ANOVA	Varianzanalyse
c-fos/c-Fos	c-fos-Gen / c-Fos-Protein
CMA	Firmenname
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CPu	Caudatus-Putamen
CSF	Cerebrospinale Flüssigkeit
D1 D2 D3 D4 D5	Dopamin-Rezeptoren-Subtypen
DAT	Dopamin-Transporter
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
EP	Entopedunculärer Nucleus
FEP	Perfluorethylenpropylen-Copolymer
GDNF	<i>glial-cell-line-derived neurotrophic factor</i>
G <sub>i</sub> /G <sub>s</sub>	Inhibierendes / stimulierendes G-Protein
GP	Globus pallidus
GPe	Externer Globus pallidus
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HSA	Heptansulfonsäure
HVA	Homovanillinsäure
IP	Ionenpaar
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MAB	Firmenname
MAO	Monoaminoxidase
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumion
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure, <i>messenger</i> RNA
NAcc	Nucleus accumbens
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ODS	Octadecylsilan
PPE	Preproenkephalin
RP	<i>Reversed phase</i> , Umkehrphasen
RRA	Retrorubrales Areal
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SNc	Substantia nigra pas compacta
SNr	Substantia nigra pas reticulata
Sth	Subthalamischer Nucleus
TH	Tyrosin-Hydroxylase
Thal	Thalamus
TSE	Firmenname
TTX	Tetrodotoxin
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
VTA	Ventraltegmentales Areal

Bezeichnungen, die im deutschsprachigen Teil der Arbeit aus dem Englischen, Lateinischen und Französischen übernommen wurden, sind im Text kursiv gedruckt.

### 3. Summary

The basal ganglia comprise several interconnected brain nuclei which have been implicated in a wide range of behavioural functions including motor, cognitive, emotional and mnemonic functions. They consist of several subcortical nuclei including the striatum, the globus pallidus, the subthalamic nucleus, the entopeduncular nucleus and the substantia nigra (with reference to the rodent terminology). In functional terms, the striatum is the main input structure of the basal ganglia receiving afferents from the entire cerebral cortex. The incoming signals to the striatum are relayed via a direct and an indirect pathway to the entopeduncular nucleus and the substantia nigra pars reticulata, which represent major output nuclei of the basal ganglia. The globus pallidus and the subthalamic nucleus are integral parts of the indirect pathway. Both nuclei are involved in signal processing and transfer between input and output structures. Recent studies showed that the globus pallidus is not solely a relay station, but in a strategic position to influence basal ganglia's information processing. An important aspect of understanding functions of the globus pallidus in the basal ganglia which has been largely neglected, is the significance of its dopaminergic innervation. There is growing evidence that the dopaminergic input to the globus pallidus may be important for intact basal ganglia functions, e.g. blockade of globus pallidus dopamine receptors inhibits motor activity in rats. In addition, clinical data reveal the pronounced loss of dopamine in the external globus pallidus, the primate homologue to the rat globus pallidus, in brains of Parkinson patients. This loss of pallidal dopamine probably contributes to motor symptoms of the disease.

The present thesis was designed to characterize the role of the dopaminergic innervation of the rat globus pallidus by *in vivo* microdialysis and immunohistochemistry in more detail.

In the first study the dopaminergic input to the globus pallidus was analyzed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in order to characterize the dopaminergic innervation pattern in the globus pallidus and to investigate effects of nigral cell loss on tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibre density in the globus pallidus after chemical destruction of dopaminergic cell bodies in the substantia nigra. Results revealed a strong correlation between the extent of the lesion in the substantia nigra and the loss of presumed dopaminergic fibre density in the globus pallidus. Furthermore, two fibre classes were distinguished according to their calibre and morphology which showed a heterogenous distribution along the rostrocaudal axis in the globus pallidus. Using *in vivo* microdialysis neurochemical data were provided to ascertain that dopamine measured in this nucleus is of neuronal origin. Perfusion of tetrodotoxin induced a strong and transient decrease of pallidal dopamine. The tetrodotoxin-sensitivity of pallidal dopamine demonstrates the functional significance of the nigropallidal dopaminergic innervation. Furthermore, the experiment with 6-hydroxy-dopamine lesions confirmed that degenerative loss of nigral dopaminergic cell bodies also affects the dopamine input of extrastriatal structures as the globus pallidus. Together these data

imply that defective dopaminergic transmission in the globus pallidus might contribute to motor symptoms induced by experimental damage to the ascending dopamine system or by its degeneration as in Parkinson's disease.

A second microdialysis study was designed to characterize the pallidal release of dopamine in response to various physiological and pharmacological stimuli which are known to stimulate dopamine efflux in nuclei of the reward circuit. Results showed that a mild aversive stimulus (handling) and a rewarding stimulus (unfamiliar, palatable food) both produced a significant increase of dialysate dopamine. Likewise, reverse microdialysis of the psychostimulants d-amphetamine or cocaine produced a dose-dependent increase in dialysate dopamine. Taken together, these data demonstrate that the dopamine transmission in the globus pallidus is as responsive as in nuclei of the reward circuit to the physiological and pharmacological stimuli described above. These findings add further support to the notion that sensorimotor structures of the basal ganglia as the globus pallidus might be also implicated in neural reward processing and point to the possibility that rewarding effects of psychostimulants involve actions on extrastriatal dopamine in the globus pallidus.

Another study investigated the neurochemical regulation of extracellular dopamine in the globus pallidus. Results showed that reverse microdialysis of glutamate receptor agonists, i.e. AMPA and NMDA, produced a significant and reversible increase of dialysate dopamine levels. These data provide the first evidence that ionotropic glutamate receptors in the globus pallidus exert excitatory actions on dopamine release which might be brought about by actions on presynaptic ionotropic glutamate receptors in the globus pallidus or involve stimulation of midbrain dopamine neurons through trans-synaptic pathways. It is speculated that an increased dopamine efflux in the globus pallidus might inhibit access of striatopallidal signals to globus pallidus neurons, i.e. subserves input selection.

The final study addressed the question whether extracellular dopamine in the globus pallidus might be another indicator to differentiate neurochemical actions of typical and atypical antipsychotic drugs. Typical antipsychotic drugs with a high extrapyramidal motor side effect liability are known to stimulate extracellular dopamine in the striatum markedly, while atypical antipsychotic drugs with a lower incidence of extrapyramidal motor side effects have less pronounced stimulating actions. Thus it has been hypothesized that the ability of antipsychotic drugs to increase extracellular dopamine in the striatum is correlated with their extrapyramidal motor side effect liability. Using *in vivo* microdialysis we compared the effects of typical and atypical antipsychotic drugs after systemic administration and after reverse microdialysis into the globus pallidus. Results showed that typical and atypical antipsychotic drugs produced very similar changes in extracellular dopamine in the globus pallidus. Thus effects on pallidal dopamine induced by antipsychotic drugs seem not be correlated with their different extrapyramidal motor side effect liability.



## 4. Einleitung

### 4.1. Basalganglien

Die Basalganglien umfassen mehrere miteinander verbundene Kerngebiete des Vorderhirns, die an der Steuerung sehr unterschiedlicher Aspekte des Verhaltens wie Motorik, Motivation und Kognition maßgeblich beteiligt sind. Im Folgenden wird zunächst ihre Anatomie beschrieben und danach grundlegende Funktionsprinzipien dieser Strukturen besprochen.

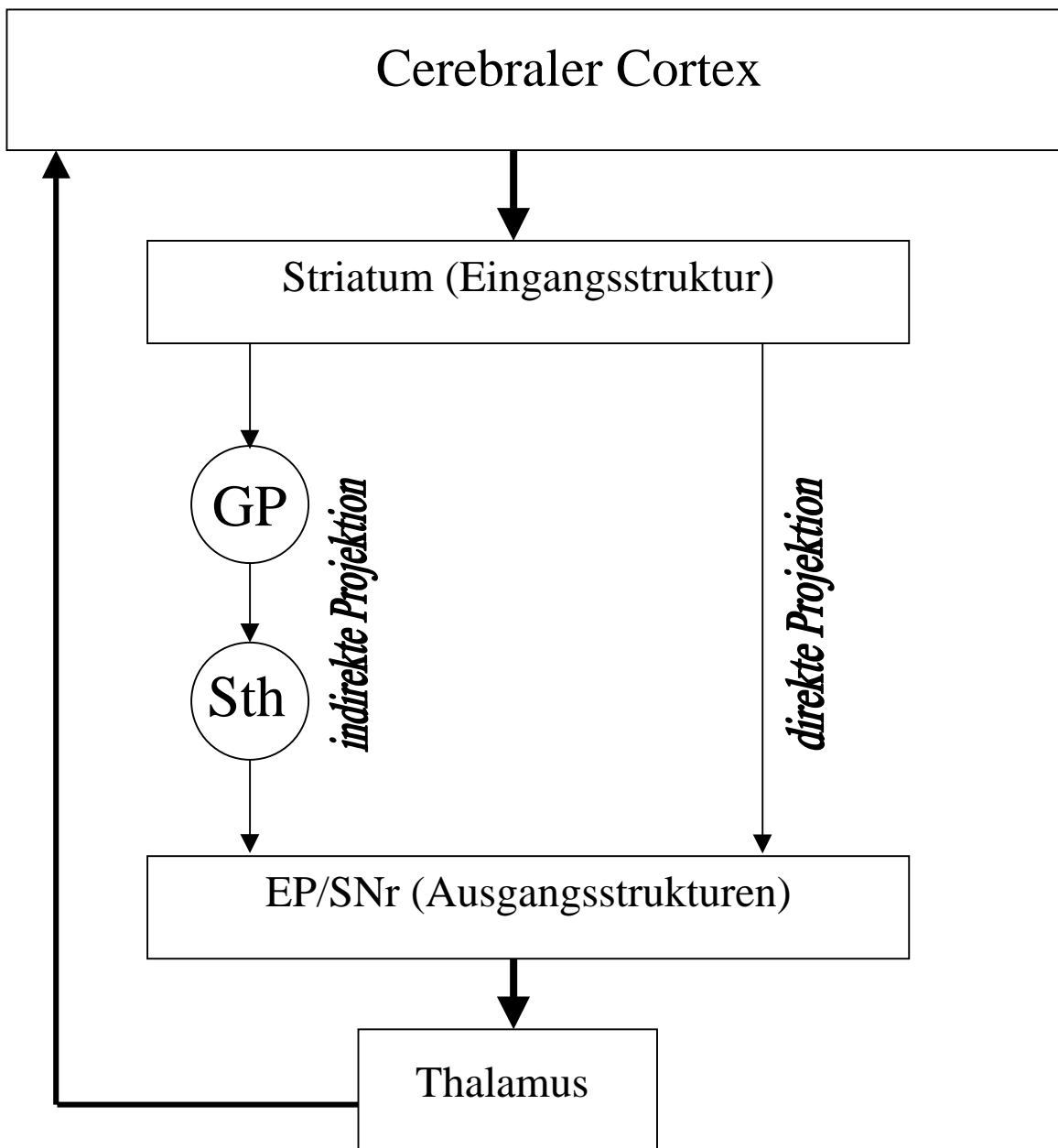
#### 4.1.1. Anatomie und Neurotransmitter

Die Basalganglien bestehen aus einer Reihe subcorticaler *Nuclei*<sup>1</sup>, die Informationen aus dem gesamten cerebralen Cortex erhalten, diese bearbeiten und über den Thalamus wieder in cortikale Bereiche weiterleiten.

Die Eingangsstruktur der Basalganglien ist das Striatum (Streifenkörper), das aus dem Nucleus caudatus, Putamen und Nucleus accumbens besteht. Nucleus caudatus und Putamen sind bei Nagern im Gegensatz zu Primaten einschließlich des Menschen eine einheitliche Struktur und werden daher als Caudatus-Putamen oder allgemein als dorsales Striatum bezeichnet. Der Nucleus accumbens bildet das ventrale Striatum und lässt sich anatomisch und funktionell in eine zentrale *‘core’* Region und eine medioventral gelegene *‘shell’* Region aufteilen. Corticale Afferenzen zum gesamten Striatum sind exzitatorisch mit Glutamat als Transmitter. Striatale Projektionsneurone sind GABAerg und hemmen nachgeschaltete Strukturen. Vom Striatum gehen zwei Hauptprojektionen aus, die als *‘direkte’* und *‘indirekte’* Projektion bezeichnet werden. Die direkte Projektion zielt ohne zwischengeschaltete Kerne auf die Ausgangsstrukturen der Basalganglien, den Nucleus entopeduncularis und die Substantia nigra pars reticulata. Bei der indirekten Projektion sind zwei weitere Nuclei, der Globus pallidus (GP) und der Nucleus subthalamicus (Sth) zwischengeschaltet. Alle striatofugalen Projektionsneurone sind GABAerg. Der Sth projiziert glutamaterg zu den Ausgangsstrukturen (Abb. 1, Übersicht in Gerfen und Wilson, 1996; Heimer et al., 1995).

---

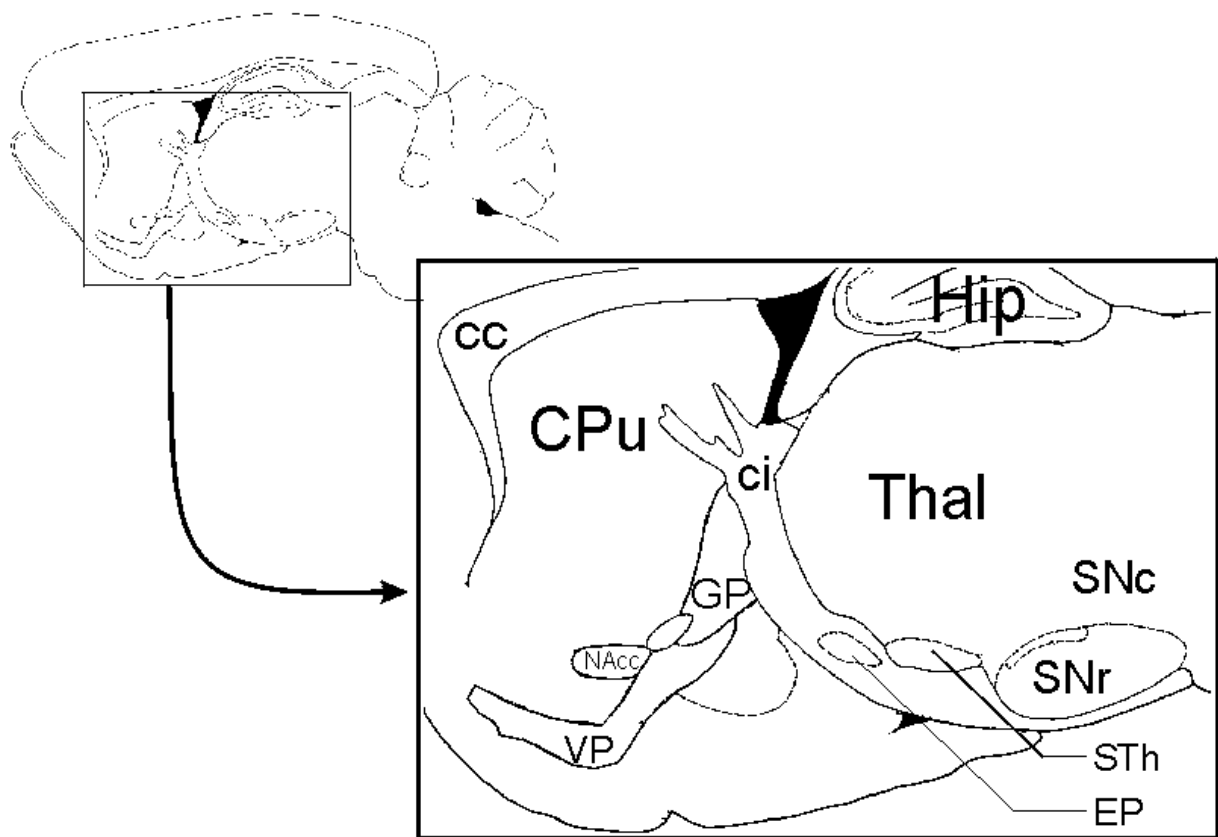
<sup>1</sup> Als Nucleus (lat. Kern) wird im Gehirn eine Ansammlung von Nervenzellkörpern bezeichnet



**Abb. 1:** Stark vereinfachte Skizze der Verschaltung der Basalganglien. Abkürzungen: GP Globus pallidus, EP entopedunculärer Nucleus, Sth subthalamischer Nucleus, SNc/r Substantia nigra pars compacta/reticulata.

Neben den schon angesprochenen Unterschieden zwischen Nagern und Primaten im Hinblick auf das Striatum bestehen auch Unterschiede in der Anatomie des Globus pallidus. Dieser ist bei allen Primaten in ein externes und ein internes Segment unterteilt. Das externe Segment (GPe) ist homolog zum Globus pallidus der Ratte, wohingegen das interne Segment eine der Ausgangsstrukturen der Basalganglien und dem Nucleus entopeduncularis der Ratte homolog ist. Trotz dieser anatomischer Unterschiede sind die Verbindungen der einzelnen

Basalganglienkerne bei Primaten und Nagern vergleichbar. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass die Basalganglien zu einem phylogenetisch sehr alten und hochkonserviertem Hirnsystem gehören (Redgrave et al., 1999a; Smeets und Gonzalez, 2000). Dadurch ist auch die Verwendung der Ratte (*Rattus norvegicus*) als Modellorganismus für die Basalganglienforschung sinnvoll, da eine Übertragbarkeit von Ergebnissen in weiten Bereichen auch auf den Menschen möglich ist.



**Abb. 2:** Schematisierter Sagittalschnitt durch das Gehirn der Ratte mit den Kernen der Basalganglien. Zur Orientierung sind Balken (cc), Hippocampus (Hip), Capsula interna (ci) und Thalamus (Thal) eingezeichnet. Weitere Abkürzungen: CPu Caudatus-Putamen [dorsales Striatum], NAcc Nucleus accumbens [ventrales Striatum], GP Globus pallidus, VP ventrales Pallidum, EP entopedunculärer Nucleus, STh subthalamischer Nucleus, SNc/r Substantia nigra pars compacta/reticulata. Modifiziert nach Paxinos und Watson (1986).

### 4.1.2. Funktionen

Eine der Kardinalaufgaben der Basalganglien ist die Steuerung von Bewegungsabläufen. Darüber hinaus sind die Basalganglien auch wesentlich an der Steuerung von kognitiven und emotionalen Hirnleistungen beteiligt (Alexander und Crutcher, 1990; Graybiel, 1997). Diese nicht-motorischen Funktionen der Basalganglien rückten erst in den letzten Jahren ins Zentrum des Interesses der Basalganglien-Forschung. Aufgrund der vielschichtigen Funktionen der Basalganglien und der noch kaum verstandenen physiologischen Organisation dieser Kerne bezeichnen Brown und Marsden (1998) in einem Artikel unter der Rubrik 'Hypothesen', in dem sie sich mit genau dieser Frage („*What do basal ganglia do ?*“) beschäftigen, die Basalganglien als 'dunkle Untergeschosse des Geistes' („*dark basements of the mind*“).

Bevor eine Hypothese zur möglichen Funktion der Basalganglien vorgestellt wird, sollen zwei funktionelle Grundprinzipien innerhalb dieses Systems beschrieben werden: die Organisation in funktionellen Schleifen und die Konvergenz.

Wie bereits erwähnt (4.1.1), arbeiten die Basalganglien in einem Schleifensystem, da der cerebrale Cortex zugleich Quelle und Ziel der Informationen ist, die die Basalganglien durchlaufen. Eine gängige Hypothese zur funktionellen Organisation dieser Schleifen geht dabei von mindestens 5 parallelen Funktionsschleifen aus. Jede dieser Funktionsschleifen ist anatomisch und funktionell voneinander getrennt, d.h. anatomisch und funktionell unterschiedliche Bereiche des Cortex, der Basalganglien und des Thalamus werden in parallelen Schleifen durchlaufen ('*parallel processing*', Alexander und Crutcher, 1990, Übersicht in Parent und Hazrati, 1995). Meist sind die Schleifen geschlossen, d.h. dasselbe corticale Ursprungsgebiet, von dem eine Schleife ausgeht ist zugleich auch Ziel der Projektion. Einige Schleifen enden jedoch in anderen corticalen Arealen als ihren Ursprungsgebieten. Man spricht dann von 'offenen' anstatt von 'geschlossenen' Schleifen (Joel und Weiner, 2000). Es ist mittlerweile klar, dass einige dieser Schleifen anatomisch und funktionell überlappen, d.h. die gleiche striatale Subregion erhält Information aus verschiedenen corticalen Bereichen (Übersicht in Gerfen, 1992). Daher steht dem Modell des '*parallel processings*' das der Kanalisierung der Information ('*information funneling*', Übersicht in Parent und Hazrati, 1995) gegenüber. Diese Hypothese geht zwar ebenfalls von verschiedenen Schleifen aus, deren Informationen aber im Zuge des Durchlaufens der Basalganglien immer mehr vermischt und schließlich zu einer Schleife integriert werden. Beide Hypothesen stimmen in einem wesentlichen Punkt überein. Sie gehen von einer Integrationsfunktion der Basalganglien aus. Dies wird deutlich, betrachtet man die Zahl der Neurone der einzelnen Kerngebiete, hier am Beispiel der Ratte: die Information von 2,79

Millionen striatalen Neuronen wird nach Durchlaufen des direkten und indirekten Weges an nur ca. 40.000 Neurone der Ausgangsstrukturen (EP, SNr) weitergegeben (Zahlen für eine Hirnhemisphäre, Oorschot, 1996). Eine starke Konvergenz ist offensichtlich (Bergman et al., 1998). Im Zuge der Integration verschiedener Informationen müssen Informationen kondensiert werden und die relevanten Anteile aus einer Vielzahl irrelevanter ausgewählt werden.

Die Funktionen der Basalganglien sind nach wie vor Gegenstand intensiver Diskussion und es liegen zahlreiche, z.T. widersprüchliche Konzepte vor, die hier nicht näher besprochen werden sollen. Ein von Redgrave et al. (1999a) unter Einbeziehung der funktionellen Anatomie der Basalganglien und basierend auf informationstheoretischen Überlegungen vorgeschlagenes Konzept sieht die Basalganglien als zentralen Mechanismus zur Lösung des 'Selektionsproblems' bei Vertebraten. Was mit dem Begriff 'Selektionsproblem' gemeint ist, soll an einem Beispiel erläutert werden: Ein Tier wird von einem Fressfeind bedroht. Entdeckt es den Räuber rechtzeitig, muss es schnell die richtige Auswahl aus alternativen und in corticalen Arealen bereits vorbereiteten Bewegungsprogrammen treffen, um der Situation angemessen zu reagieren. Angemessenes Verhalten des Tieres wäre vielleicht Flucht, also schnellstes Laufen. Unangemessenes Verhalten wäre dagegen das Putzen des Fells oder Fressverhalten, da es dieses dem Räuber leicht machen würde, das Tier zu schlagen. Auch wenn diese Situation zunächst nur eine richtige Verhaltensweise, nämlich die Flucht, nahe legt, so können unter bestimmten Umständen andere Reaktionsmöglichkeiten besser sein. Je nach Umgebung wäre es vielleicht sinnvoller, sich totzustellen, damit das Tier vom Räuber übersehen wird. Eine starre Verknüpfung Räuber-Flucht ist daher ungünstig und ein hohes Maß an Flexibilität ist in diesem Auswahlprozess unabdingbar. So wird bereits an diesem Beispiel klar, wie komplex ein derartiges Selektionsproblem sein kann und welche Leistungen die Basalganglien erbringen müssen, um ein der Situation gerecht werdendes Verhalten hervorzubringen. Diese Leistung ist von ganz zentraler Bedeutung für das Überleben eines Individuums und damit auch für den Bestand der Art. Dies erklärt auch die phylogenetische Konservativität dieses Systems.

### *4.1.3. Dopaminerge Systeme*

Im Folgenden soll zunächst die dopaminerge Innervation innerhalb der Basalganglien vom anatomischen Gesichtspunkt her erläutert werden. Auf Biochemie, Physiologie und

Pharmakologie des Dopamin-Systems wird dann in einem gesonderten Kapitel eingegangen (4.3).

Die dopaminerge Innervation der Basalganglien hat ihren Ursprung in drei Neuronengruppen des Mittelhirns: das Retrorubrale Areal (RRA), die Substantia nigra pars compacta (SNc) und das Ventral Tegmentale Areal (VTA), die auch als A8, A9 und A10 bezeichnet werden (Übersicht in Nieuwenhuys, 1985; Smeets und Gonzalez, 2000; Smith und Kieval, 2000). Axone dieser dopaminergen Mittelhirnneurone projizieren im medialen Vorderhirnbündel oder über die Capsula interna in verschiedene Regionen des Vorderhirns. Daher wird auch von „aufsteigenden“ Dopamin-Systemen gesprochen (Fuxe et al., 1985).

Anhand der Hauptprojektionen wurden zwei dopaminerge Systeme innerhalb der Basalganglien unterschieden: das nigrostriatale, das hauptsächlich von der SNc ausgehend das dorsale Striatum (Tab. 1) innerviert, und das mesolimbisches Dopamin-System, welches ausgehend von der VTA hauptsächlich in das ventrale Striatum (Tab. 1) zieht. Beide Systeme werden heute zusammen als mesostriatales System bezeichnet (Nieuwenhuys, 1985); es umfasst alle drei Ursprungsgebiete dopaminergener Neurone (A8, A9, A10) und deren Hauptzielgebiet, das gesamte Striatum.

Ein weiteres Dopamin-System umfasst dopaminerge Neurone der VTA, die Areale im frontalen Cortex innervieren, und wird entsprechend als mesocorticales Dopamin-System bezeichnet (Fuxe et al., 1985).

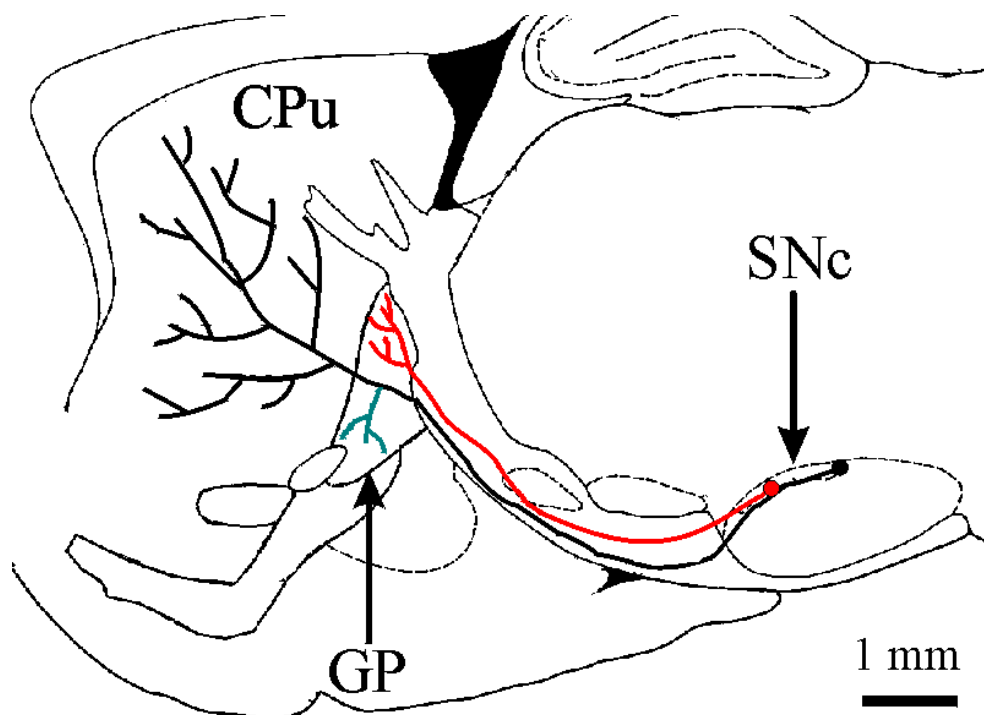
Hinsichtlich der Nomenklatur dieser dopaminergen Systeme existiert keine in allen Punkten einheitliche Anwendung, da dopaminerge Neurone verschiedener Ursprungsgebiete das gleiche Terminationsgebiet haben können und Neurone aus dem gleichen Ursprungsgebiet auch in Zielstrukturen eines anderen Dopamin-Systems projizieren (Nieuwenhuys, 1985). Entsprechend wird die Bezeichnung nach dem jeweils betrachteten Teilsystem gewählt.

Außer dem Striatum erhalten noch weitere Kerne der Basalganglien eine dopaminerge Innervation aus dem Mittelhirn, so z.B. der Globus pallidus (Fallon und Moore, 1978; Lindvall und Björklund, 1979) (4.2.3), das ventrale Pallidum (Gaykema und Zaborszky, 1996) und der Nucleus subthalamicus (Hassani et al., 1997; Meibach und Katzman, 1979). Da diese Innervation auf Strukturen außerhalb des Striatums gerichtet ist, spricht man auch von einem extrastriatalen dopaminergen System bzw. extrastriatalem Dopamin (Prensa et al., 2000). Ein Subsystem dieser extrastriatalen dopaminergen Innervation der Basalganglien ist die nigropallidale Projektion (Smith und Kieval, 2000), die einige strukturelle und funktionelle Besonderheiten aufweist (4.2.3). Die Untersuchung dieses nigropallidalen Dopamin-Systems ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird nachfolgend genauer

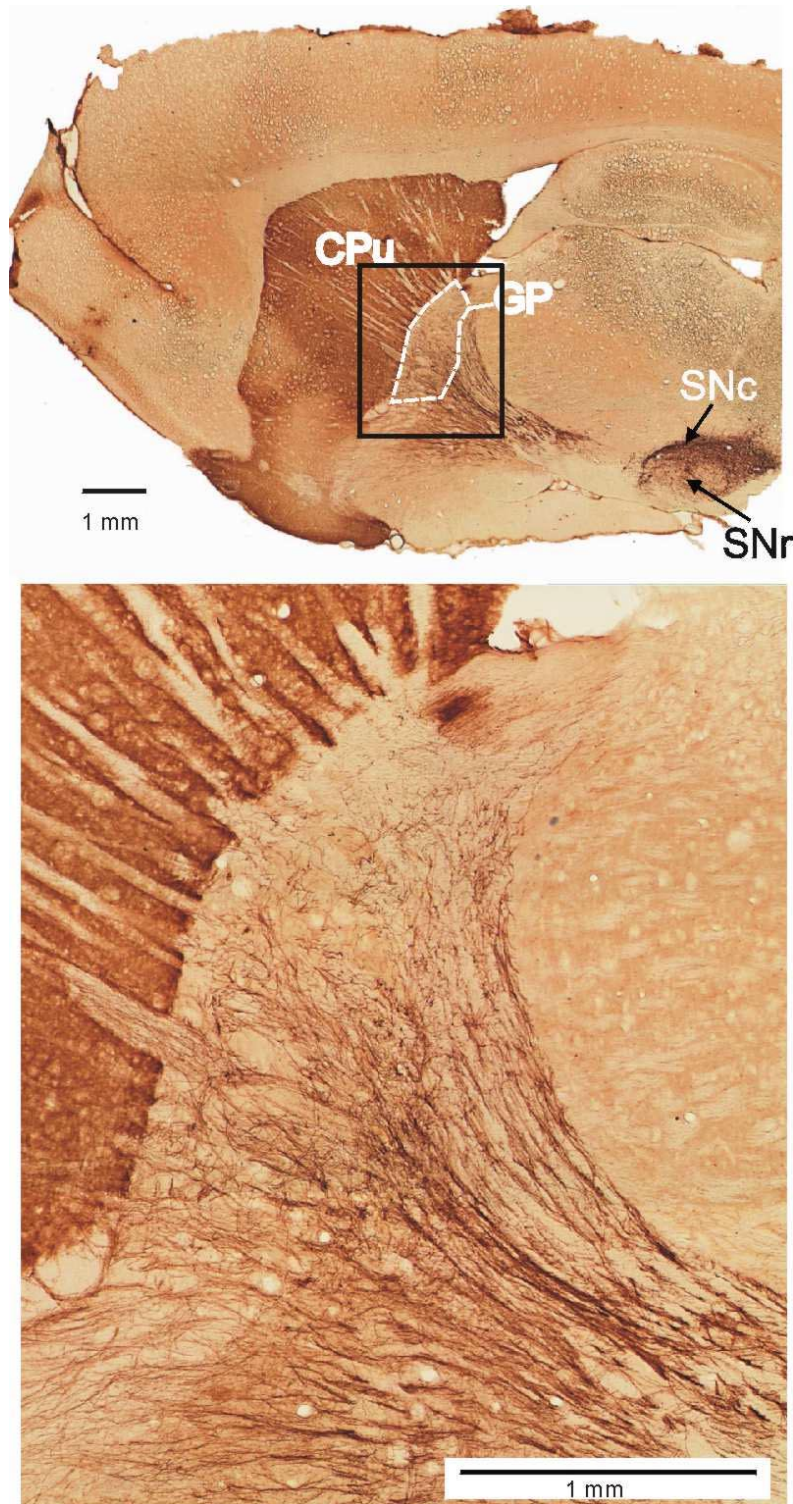
beschrieben. Eine Übersicht der hauptsächlichlichen Ursprungs- und Zielgebiete der hier angesprochenen dopaminergen Systeme ist in Tab. 1 dargestellt.

**Tab. 1:** Übersicht der wichtigsten Zielgebiete dopaminergener Neurone der SNc und VTA

Ursprungsgebiet	Zielgebiet
SNc (A9)	Dorsales Striatum
	Globus pallidus
	Nucleus subthalamicus
VTA (A10)	Ventrales Striatum (NAcc)
	Ventrales Pallidum
	Präfrontaler Cortex



**Abb. 3:** Dopaminerge Innervation des GP der Ratte. In der Skizze sind zwei grundsätzliche Möglichkeiten der dopaminergen Innervation des GP skizziert: Axonkollaterale nigrostriataler Fasern (grün) oder separate nigropallidale Projektionen (rot). Repräsentativ für beide Möglichkeiten ist der Axonverlauf zweier individueller Neurone vom Ursprungsgebiet (SNc, roter bzw. schwarzer Punkt) bis zum Zielgebiet (GP/CPu bzw. GP) in einer Skizze eines Sagittalschnitts durch das Rattengehirn (modifiziert nach Paxinos und Watson, 1986) dargestellt.



**Abb. 4:** Sagittalschnitt durch das Gehirn einer Ratte mit immunhistochemischer Färbung der Tyrosin-Hydroxylase (TH), einem Marker für dopaminerge Neurone (4.3.1). Deutlich zu erkennen ist das Ursprungsgebiet der dopaminergen Innervation, die SNc, zum Striatum (CPu) ziehende Fasern und die dortige dichte dopaminerge Innervation. Der GP ist im unteren Bild vergrößert dargestellt und zeigt ebenfalls TH-immunreaktive Fasern.



### 4.1.4. Rolle des Dopamins in den Basalganglien

Die Aktivität der Ausgangsstrukturen der Basalganglien wird durch die direkte und indirekte Projektion (4.1.1) in antagonistischer Weise bestimmt. Eine Aktivierung striataler Neurone der direkten Projektion resultiert in einer vermehrten GABA Freisetzung und damit Hemmung der Ausgangsstrukturen, während die Aktivierung striataler Neurone, die der indirekten Projektion angehören, letztlich in einer Aktivitätserhöhung der Ausgangsstrukturen resultiert. Die Gesamtaktivität der Ausgangsstrukturen kann durch die dopaminerge Innervation des Striatums moduliert werden. Während striatale Neurone der direkten Projektion Dopamin D1-Rezeptoren (näher beschrieben in 4.3.3) tragen und damit durch Dopamin stimuliert werden, tragen striatale Neurone der indirekten Projektion (striatopallidale Projektionsneurone) D2-Rezeptoren (näher beschrieben in 4.3.3) und werden durch Dopamin in ihrer Aktivität gehemmt (Übersicht in Gerfen und Wilson, 1996). Entsprechend kann Dopamin die Gesamtaktivität der Ausgangsstrukturen durch Modulation der Aktivität striataler Neurone entscheidend beeinflussen. Betrachtet man nur den motorischen Teil der Basalganglien, so führt eine gesteigerte neuronale Aktivität der Ausgangsstrukturen durch die dadurch verstärkte Inhibition des Thalamus zu einer verminderten motorischen Aktivität, wohingegen eine Hypoaktivität der Ausgangsstrukturen in einer motorischen Aktivierung resultiert. Wie wichtig ein intaktes Dopamin-System für eine normale Motorik ist, wird beim Betrachten der Ausfallerscheinungen bei Morbus Parkinson Patienten (4.1.5) deutlich. Diese Erkrankung ist durch einen Dopamin-Mangel der Basalganglien gekennzeichnet und äußert sich symptomatisch vor allem durch eine schwer gestörte Motorik, die im Endstadium bis zur vollständigen Bewegungslosigkeit führen kann (4.1.5).

Je weiter sich der Betrachtungsstandpunkt vom Maßstab einer Synapse oder eines Neurons weg zu ganzen Kernen oder Netzwerken bewegt, desto komplexer und unverstandener ist die Funktion des Dopamins und seine Beteiligung bei der Steuerung der verschiedensten Hirnfunktionen. Neben der Motorik ist Dopamin wesentlich an der Steuerung motivationaler und emotionaler Prozesse beteiligt (Berridge und Robinson, 1998). Dopamin wird in den verschiedenen Innervationsgebieten auf eine ganze Reihe unterschiedlicher Stimuli hin ausgeschüttet (Horvitz, 2000). Um den kleinsten gemeinsamen Nenner zu finden, könnte man das Dopamin-Signal in Zusammenhang mit biologisch relevanten Stimuli bringen, die auch aversiv sein können (Redgrave et al., 1999b), da es sowohl bei Belohnung und Neuheit (*novelty*) als auch bei Stress (*Handling*, Restriktion) zur Dopamin-Freisetzung in

verschiedenen Hirnregionen kommt (Bassareo und Di Chiara, 1997; Feenstra et al., 1999, stellvertretend für eine Reihe entsprechender Mikrodialysearbeiten).

Eine wichtige Struktur für die Steuerung motivationaler Vorgänge ist das ventrale Striatum, der Nucleus accumbens. Dieser ist als Teil des Belohnungssystems eine Schnittstelle, über die limbische Strukturen Zugang zum motorischen System haben. Ein intaktes Belohnungssystem ist wiederum sehr wichtig für die Überlebensfähigkeit von Tieren bzw. der Tierspezies, da ohne dieses kein "innerer Antrieb" zu vielen Verhaltensweisen bestünde. Unser Beispieltier würde keine Motivation empfinden, Nahrung aufzunehmen oder sich mit einem Geschlechtspartner zu paaren. Beides wäre für das Überleben des Individuums und die Erhaltung der Art nachteilig. Pathologische Prozesse innerhalb des Belohnungssystem bilden letztendlich die Grundlage für Suchterkrankungen (Berridge und Robinson, 1998; Di Chiara, 1999).

Interessant im Zusammenhang mit dem Thema dieser Arbeit ist die Tatsache, dass es in Basalganglienkernen, die der rein motorischen Schleife zugeordnet werden, wie z.B. dem GP, auch zu einer Dopamin-Freisetzung auf biologisch relevante Stimuli kommt (Hauber und Fuchs, 2000). Einem Radiosignal vergleichbar (Schultz, 1998), wird das Dopamin-Signal vom Mittelhirn nicht nur in den NAcc, sondern auch in motorische Regionen „ausgestrahlt“, wobei es von der jeweiligen Region abhängt, ob und in welcher Form das Signal „empfangen“ und verarbeitet wird.

Eine Freisetzung von Dopamin kann, abhängig vom Kontext und Kerngebiet, am Selektionsprozess der Basalganglien (s.o.) beteiligt sein. So wird sie als Signal zum Umschalten (*switching*) zwischen konkurrierenden Bewegungsabläufen, wie z.B. Weglaufen oder Nahrungsaufnahme, gesehen und stellt damit eine ganz wesentliche Komponente des Selektionssystems der Basalganglien dar (Redgrave et al., 1999a).

Eine noch schwieriger zu beantwortende Frage ist die nach den Ursachen und Mechanismen, die zur Aktivierung dopaminerger Neurone führen. Woher bekommen die Dopamin-Neurone des Mittelhirns die Information über wichtige, biologisch relevante Stimuli? Wichtige Informationen scheinen z.B. von der Amygdala und anderen corticalen Arealen zu stammen (Kalivas und Nakamura, 1999).

### 4.1.5. *Erkrankungen der Basalganglien*

Erkrankungen der Basalganglien beim Menschen äußern sich in erster Linie in einer schwer gestörten Motorik, aber auch in kognitiven Defiziten (Brown und Marsden, 1998), auf die hier

nicht näher eingegangen werden kann. Betrachtet man die Bewegungsstörungen (engl. *movement disorders*) nach Erkrankungen der Basalganglien, so lassen sich diese in drei Kategorien einteilen (Albin et al., 1989): 1.) Die hyperkinetischen Störungen, die durch ein Auftreten von unkontrollierten Bewegungsabläufen charakterisiert sind. 2.) Die hypokinetischen Störungen, bei denen die normale Motorik stark gehemmt ist und schließlich 3.) die Dystonie, eine pathologische Veränderung des Tonus einzelner Muskelgruppen.

Die bekannteste hypokinetische Bewegungsstörung ist die **Parkinsonsche Krankheit** (Morbus Parkinson) oder auch Schüttellähmung genannt, mit einer jährlichen Inzidenz von 20 pro 100000 und einer Prävalenz von 100-200 pro 100000 Einwohnern. Schätzungen zufolge sind etwa 1 % der 65-jährigen (Lexikon der Neurowissenschaften, 2001) betroffen. Krankheitsursache ist eine Degeneration der dopaminergen Systeme, besonders des nigrostriatalen Systems (4.1.3). Morbus Parkinson ist durch die folgenden motorischen Kardinalsymptome gekennzeichnet (Poeck und Hacke, 1998):

- Bradykinesie (verlangsamte Bewegungen) bis hin zur Akinesie (Bewegungslosigkeit)
- Rigor (Starre, Erhöhung Muskeltonus)
- Tremor (Zittern)
- Störungen gleichgewichtserhaltender Reflexe

**Chorea Huntington** oder der sog. Veitstanz ist eine schwerwiegende hyperkinetische Bewegungsstörung, die durch eine pathologische Veränderung der Basalganglien verursacht wird. Es handelt sich um eine Erbkrankheit mit nahezu vollständiger Penetranz und 100%iger Mortalität, bei der bestimmte Projektionen innerhalb der Basalganglien betroffen sind, daneben aber auch Regionen außerhalb der Basalganglien atrophieren. Vor allem die striatopallidale Projektion ist bei Chorea Huntington schon in Frühstadien geschädigt. Die Krankheit ist durch eine unkontrollierte Kontraktion einzelner Muskeln oder Muskelgruppen gekennzeichnet, die im fortgeschrittenen Stadium zu völlig unkontrollierten Bewegungen der Extremitäten führt und geordnete Bewegungsabläufe unmöglich macht (Poeck und Hacke, 1998).

Schließlich ist in diesem Zusammenhang noch der **Ballismus** zu nennen, dessen Ursache in Schädigung des Sth durch Tumoren, Blutungen oder Infektionen liegt, und der ebenfalls zu den hyperkinetischen Bewegungsstörungen gezählt wird. Der Ballismus ist meist einseitig ausgeprägt (Hemiballismus). Er ist ebenfalls durch unwillkürliche Bewegungen

gekennzeichneten, die sich jedoch im Ablauf und Geschwindigkeit von Hyperkinesien der Chorea Huntington unterscheiden (Löschmann und Schulz, 1997).

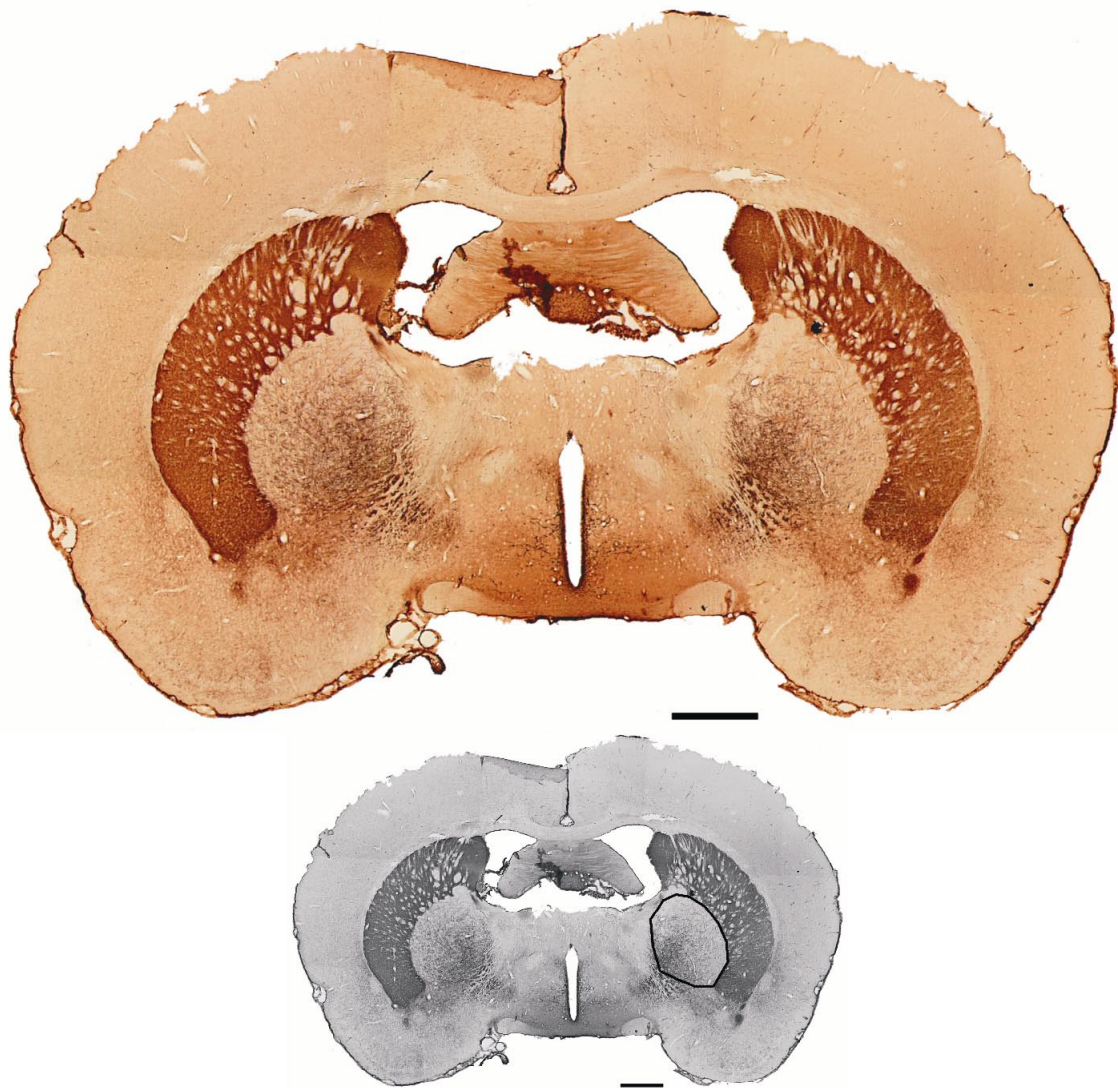
**Dystonien** sind Begleitsymptome zahlreicher neurologischer Erkrankungen oder treten als eigenständige Störung auf. Entsprechend vielfältig sind ihre Erscheinungsformen. Generell sind Dystonien durch langsame, unwillkürliche Tonussteigerungen und Bewegungen, sowie durch abnorme Haltung charakterisiert (Löschmann und Schulz, 1997). Über die Ursachen ist, außer der Tatsache, dass Dystonien immer mit Schädigungen von Gebieten der Basalganglien einhergehen, wenig bekannt.

Bei den beiden häufigsten Erkrankungen der Basalganglien, Morbus Parkinson und Chorea Huntington, ist die Aktivität der dem Striatum nachgeschaltetem Kerngebiete im Vergleich zum Normalzustand verändert. Während bei Parkinson Patienten die Ausgangsstrukturen infolge geringerer Aktivität des GPe verstärkt aktiv sind und damit zu einer verstärkten Hemmung des Thalamus führen (hypokinetische Erkrankung), ist bei Chorea Huntington eine Hyperaktivität des GPe und infolgedessen geringere Aktivität der Ausgangsstrukturen festzustellen, die folglich zu einer Disinhibition des Thalamus führt (hyperkinetische Erkrankung) (Albin et al., 1989; Wichmann und DeLong, 1996)

### **4.2. Globus pallidus der Ratte**

Der Name 'Globus pallidus' bedeutet aus dem Lateinischen übertragen 'bleiche Kugel', was sich auf seine runde Form (Abb. 5) und auf sein im nativen Hirn relativ helles, bleiches Aussehen zurückführen lässt.

Der (dorsale) Globus pallidus und das ventrale Pallidum bilden zusammen den pallidalen Komplex oder verkürzt das Pallidum. Dabei geht der GP kontinuierlich in das ventrale Pallidum über. Eine scharfe Grenze ist nicht zu ziehen, das ventrale Pallidum wird näherungsweise als unter der vorderen Kommissur gelegener (subcommissuraler) Teil des Pallidums angesehen (Heimer et al., 1995) .



**Abb. 5:** Frontalschnitt durch das Gehirn einer Ratte mit immunhistochemischer Färbung der TH (oben). Die eingezeichnete Linie entspricht einem Millimeter. Die Grenzen des GP einer Hemisphäre sind in der verkleinerten Abbildung (unten) markiert.

#### 4.2.1. Cytoarchitektur

Die meisten Neurone des GP werden als groß, fusiform (spindelförmig) oder dreieckig mit langen, dicken, glatten und nur spärlich verzweigenden Dendriten klassifiziert. Sie sind GABAerg und die Dendriten tragen meist sog. *spines* (dornartige Fortsätze) (Heimer et al., 1995, morphologisch im Detail beschrieben von Millhouse, 1986). Die Gesamtzahl der Neurone im GP der Ratte (unilateral) liegt bei ca. 46.000 (Oorschot, 1996).

Im GP sind auch Neurone zu finden, die Bestandteil des „basalen Vorderhirns“ (*basal forebrain*) sind. Das basale Vorderhirn umfasst Areale, in denen relativ weitläufig gestreut acetylcholinerge Neurone liegen (Zaborszky und Duque, 2000), die zu corticalen Arealen ziehen (McKinney et al., 1983) und aus denen der Hauptanteil des corticalen Acetylcholins stammt (Eckenstein et al., 1988) (Übersicht in Heimer et al., 1997). Das System des basalen Vorderhirns hat maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität corticaler Areale und ist damit an der Kontrolle der Wachheit und der Aufmerksamkeit (*arousal*) beteiligt (Jones, 1993; Sarter und Bruno, 2000; Heimer, 2000).

Entsprechend ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften können pallidale Neurone in drei Subtypen unterteilt werden, wobei einer den acetylcholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns (s.o.) entspricht (Cooper und Stanford, 2000).

Hinweise auf pallidale Interneurone gibt es bislang nicht (Cooper und Stanford, 2000), allerdings wird die Existenz von rekurrenten Kollateralen innerhalb des GP vermutet, die laterale Inhibition ermöglichen würden (Ogura und Kita, 2000; Stanford und Cooper, 1999).

Eine diskrete Gruppe von Neuronen, die aufgrund ihrer Lokalisierung entlang der Grenzen zwischen externem und internem GP von Primaten als pallidale „border“ Zellen (engl. *border* = Grenze) bezeichnet werden, fällt wegen ihrer scheinbar selektiven dopaminergen Innervation auf (Bezard et al., 2001). Inwieweit sie überhaupt als pallidale Neurone zu bezeichnen sind und welche Funktion sie erfüllen können, ist noch unklar.

### 4.2.2. *Afferenzen und Efferenzen*

Wie bereits erwähnt, ist eine starke anatomische Konvergenz innerhalb der Basalganglien zu erkennen. Diese ist besonders auf pallidaler Ebene ausgeprägt. 46.000 Neurone des GP erhalten Afferenzen von einem Großteil der 2,79 Millionen striatalen Neurone über die indirekte Projektion. Dem GP nachgeschaltet sind 13.600 subthalamische Neurone und 26.300 Neurone des SNr (Oorschot, 1996). Damit ist offensichtlich, dass der GP ein kritischer Flaschenhals innerhalb des Signalfusses der Basalganglien darstellt.

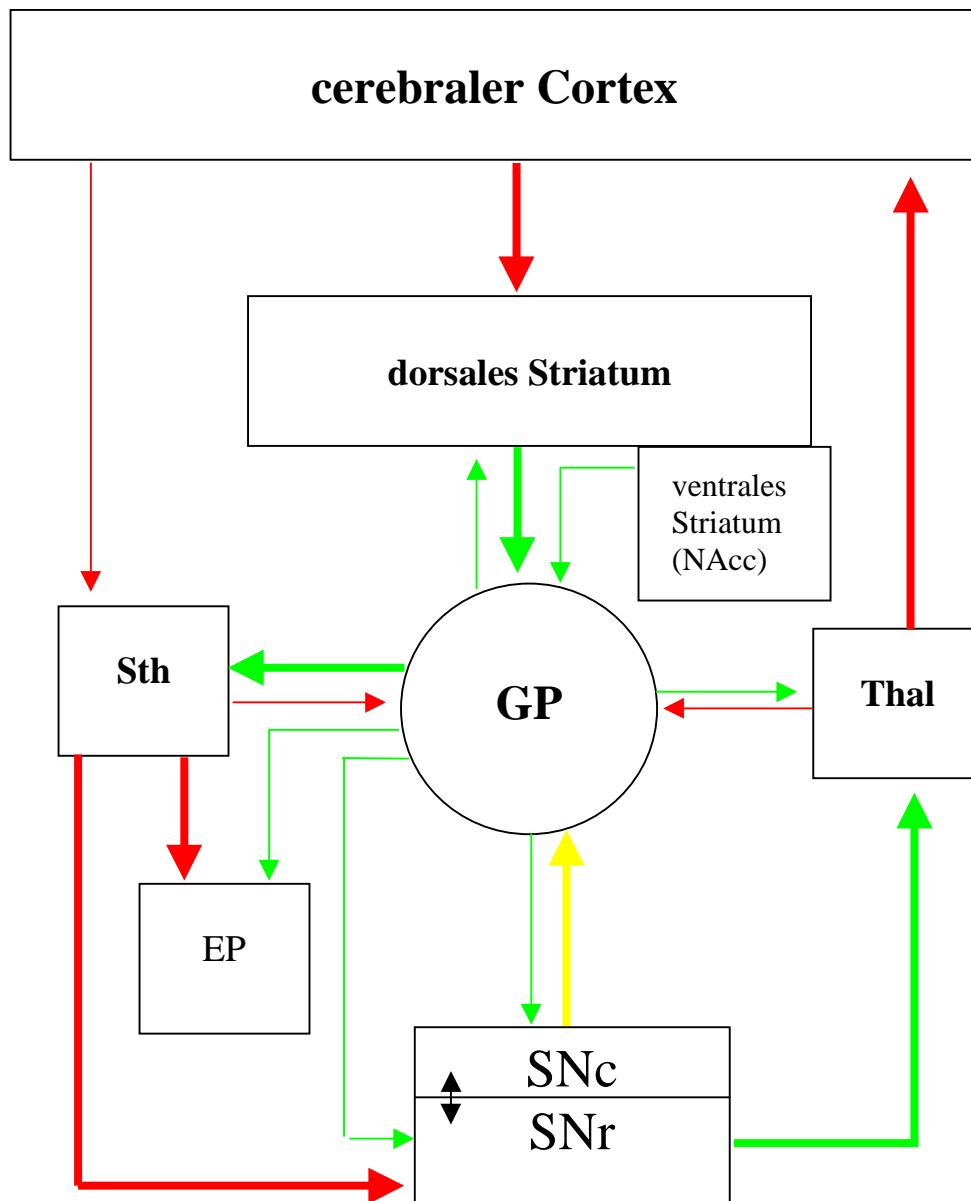
Hauptafferenzen des GP sind, wie bereits erwähnt, striatale GABAerge Projektionen. Die striatopallidalen Neurone sind zusätzlich enkephalinerg und werden auf striataler Ebene hauptsächlich über D2-Rezeptoren (4.3.3) dopaminerg moduliert (Parent und Hazrati, 1995). Neben Afferenzen aus dem dorsalen Striatum erhält der GP auch GABAerge Projektionen aus dem ventralen Striatum (NAcc) (Jones und Mogenson, 1980a; 1980b).

Weitere wichtige Afferenzen erhält der GP vom Sth mit Glutamat als Transmitter. Da der Sth auch gleichzeitig die Hauptefferenz des GP ist, sind beide Kerne in einer Art reziproker Projektion verschaltet. Beide Kerne werden als wichtige Schrittmacher innerhalb der Basalganglien diskutiert (Plenz und Kitai, 1999, Wichmann und DeLong, 1999). Eine Besonderheit des Sth ist seine direkte Afferenz aus corticalen Arealen, so dass der GP über den Sth auch corticale Informationen erhält, die nicht über das dorsale Striatum vermittelt sind (Wichmann und DeLong, 1999). Sowohl striatale als auch subthalamische Afferenzen konvergieren auf jeweils den gleichen pallidalen Zellen (Levy et al., 1997). Daneben erhält der GP noch Afferenzen vom parafasciculären Nucleus des Thalamus (Deschenes et al., 1996; Mouroux et al., 1997), die ebenfalls exzitatorisch sind und Glutamat als Transmitter verwenden (Levy et al., 1997).

Wie schon erwähnt und im nachfolgenden Teil detailliert besprochen wird der GP von dopaminergen Neuronen der SNc innerviert. Hinweise für eine untergeordnete Rolle von Noradrenalin existieren ebenfalls (Napier et al., 1991). Auch das serotonerge System innerviert den GP. Ursprung der serotonergen Innervation sind die Raphekerne, hauptsächlich der dorsale Nucleus raphe (Charara und Parent, 1994; McQuade und Sharp, 1997). Unter den Afferenzen aus den aufsteigenden monoaminergen Systemen des Mittelhirns (dopaminerges, noradrenerges und serotonerges System) spielt die dopaminerge Afferenz vermutlich die größte Rolle (Ruskin et al., 2001).

Außer zum Sth projiziert der GP direkt zum EP (Parent und Hazrati, 1995) bzw. zum GPi bei Primaten (Sato et al., 2000) und der SNr (Smith und Bolam, 1990), also den Ausgangsstrukturen der Basalganglien. Dabei ist bemerkenswert, dass striatale und pallidale Neurone synaptische Kontakte auf denselben Neuronen der SNr und des EP haben (Smith et al., 1998; Smith und Bolam, 1991), wobei jedoch die striatalen Axone weiter distal und die pallidalen eher proximal in Kontakt mit den Dendriten dieser Neurone treten (Parent et al., 2000; Smith und Bolam, 1991). Dadurch sind pallidonigrale Projektionsneurone im Vergleich zu striatonigrale Projektionen durch eine dem Zellkörper nähere und damit strategisch bessere Position in der Lage, einen stärkeren Einfluss auf deren Aktivität auszuüben (Gerfen und Wilson, 1996). Neben der SNr innerviert der GP ebenfalls die SNc und damit das Ursprungsgebiet dopaminerge Neurone (Paladini et al., 1999). Wenig untersucht, aber funktionell vermutlich nicht unwichtig, ist die pallidale Rückprojektion zum Striatum (Heimer et al., 1995). Dabei scheint eine Subklasse pallidaler Neurone GABAerge Interneurone des Striatums zu innervieren (Bevan et al., 1998).

Unter Umgehung der Ausgangsstrukturen projiziert der GP direkt zum Thalamus und hat damit eine weitere Einflussmöglichkeit, die Information aus den Basalganglien zu modulieren (Übersicht in Smith et al., 1998). Alle pallidalen Efferenzen sind GABAerg, abgesehen von den im Bereich des GP liegenden acetylcholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns (s.o.).



**Abb. 6:** Afferenzen und Efferenzen des Globus pallidus (GP) der Ratte. Projektionen des indirekte Weges sind mit dicken Pfeilen, GABAerge Projektionen grün, glutamaterge rot und dopaminerge gelb gezeichnet. Abkürzungen: Sth Subthalamischer Nucleus, EP Entopedunculärer Nucleus, Thal Thalamus, SNc/r Substantia nigra pars compacta/reticulata.



### 4.2.3. Dopaminerge Innervation des Globus pallidus

#### Tracer-Experimente

Um Ursprungs- bzw. Zielgebiete eines Nervenfasertraktes zu charakterisieren, werden sog. *Tracer* (von engl. *trace*=Spur) eingesetzt. Dies sind meist Proteine oder radioaktiv markierte Aminosäuren, die von Zellkörpern oder Axonen aufgenommen werden und entweder in Richtung der normalen Informationsübertragungsrichtung oder dieser entgegengesetzt transportiert werden. Entsprechend werden sie als anterograde oder retrograde *Tracer* bezeichnet. Diese Stoffe werden stereotaktisch in einzelne Strukturen des Gehirns eingebracht und nach einer gewissen Wartezeit, die von der Transportgeschwindigkeit abhängt, wird das Gehirn immunhistochemisch oder autoradiographisch aufgearbeitet, um somit die Lokalisation der *Tracer* bestimmen zu können. Daneben ist es möglich nach einer speziellen Fixierungsmethode dopaminerge und noradrenerge Neurone zur Fluoreszenz anzuregen (Lindvall et al., 1973). Dadurch können in Serienschnitten Projektionen vom Ursprungsgebiet, in dem die Zellkörper liegen, bis hin zum Terminationsgebiet verfolgt werden.

Mit diesen Methoden wiesen Fallon und Moore (1978) sowie Lindvall und Björklund (1979) eine Innervation des GP der Ratte nach, die aus der Substantia nigra stammt. Im Unterschied zu der bis dahin bestehenden Auffassung, dass catecholaminerge Fasern im GP nur zum Striatum durchziehende Axone seien, die keine Innervation des GP ausbilden, konnten sie eine, wenn auch spärliche, Innervation durch Axonkollaterale und Varikositäten in räumlicher Nähe zu pallidalen Neuronen zeigen.

Auch im Primatengehirn konnte eine dopaminerge Innervation des GPe gezeigt werden (Charara und Parent, 1994; Jan et al., 2000; Sato et al., 2000; Smith et al., 1989) und schließlich gelangen Gauthier et al. (1999) die Darstellung des Axonverlaufs einzelner Neurone vom Ursprungsgebiet in der Substantia nigra bis hin zum gesamten Terminationsgebiet im GP und Striatum der Ratte. Dabei wurde bemerkt, dass die verfolgten Axone einzelner dopaminerger Neurone der SNc zwei unterschiedliche Verzweigungs (Arborisations-) Muster zeigten: Axonkollaterale verzweigten sich entweder nahezu ausschließlich in striatalen Bereichen oder in extrastriatalen Kernen wie dem GP. Dies wird als anatomisches Indiz für ein getrenntes nigropallidales Dopamin-System gewertet (Gauthier et al., 1999).

### Tyrosin-Hydroxylase immunoreaktive Elemente

Die Tyrosin-Hydroxylase (TH) ist ein Schlüsselenzym catecholaminerger Neurone (4.3.1) und kann aufgrund der geringen Dichte noradrenerger Neuronen in den Basalganglien als Marker für dopaminerge Neurone angesehen werden (Jan et al., 2000; Lavoie et al., 1989). Immunhistochemische Färbemethoden der TH zeigen morphologische Eigenschaften des gesamten Neurons, da die TH in allen zellulären Teilstrukturen (Perikaryon, Dendriten, Axone und Endigungen) nachzuweisen ist. Neben der lichtmikroskopischen Auswertung kann auch die ultrastrukturelle Lokalisation der TH mit elektronenmikroskopischen Techniken untersucht werden.

Mit Hilfe dieser Technik wurden TH-positive Axone im GP der Ratte (Arluison et al., 1984; Rodrigo et al., 1998; Zaborszky und Cullinan, 1996), im GPe von Primaten (Jan et al., 2000; Lavoie et al., 1989) einschließlich des Menschen (Hedreen, 1999; Jan et al., 2000) nachgewiesen. Aufgrund der räumlichen Nähe zu pallidalen Neurone (Lindvall und Björklund, 1979; Arluison et al., 1984) und acetylcholinergen Neuronen (Rodrigo et al., 1998; Zaborszky und Cullinan, 1996) werden direkte synaptische Kontakte zu diesen Neuronengruppen des GP vermutet. Cossette et al. (1999) beschreiben TH-immunoreaktive Fasern im menschlichen Pallidum (GPe und GPi), die *en passant* (im Vorbeiziehen) Kontakte zu pallidalen Neuronen bilden. Es handelt sich hierbei um weiterziehende Fasern zum Striatum. Da übereinstimmend auch von Varikositäten berichtet wird, die keine direkte Nähe zu postsynaptischen Strukturen haben (Cossette et al., 1999), liegt die Vermutung einer diffusen Innervation im Sinne der Volumentransmission (4.3.4) nahe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die anatomischen Befunde eine nicht zu vernachlässigende dopaminerge Innervation des GP der Ratte und des GPe von Primaten einschließlich des Menschen belegen.

### Dopamin-Rezeptoren im GP

Im GP wurden alle bekannten Dopamin-Rezeptor-Typen der D1- und D2-Rezeptor-Klassen (näher beschrieben in 4.3.3) nachgewiesen, wenn auch über die genaue zelluläre Lokalisation der meisten Subtypen die vorliegenden Daten lückenhaft sind.

Naheliegend ist die Existenz von D2-Rezeptoren auf striatopallidalen Terminalen, da striatale Neurone der indirekten Projektion im Zellkörperbereich D2-Rezeptoren tragen (Gerfen und Wilson, 1996). Entsprechend konnte die präsynaptische Lokalisation im GP von Mansour et al. (1990) bestätigt werden. In dieser Studie konnten auch postsynaptische D2-Rezeptoren auf

pallidalen Neuronen nachgewiesen werden. Bindestellen für D2-Rezeptor-Liganden und D2-Rezeptor-Protein konnten im GP der Ratte, Katze, Primaten einschließlich des Menschen nachgewiesen werden (Boyson et al., 1986; Camps et al., 1990; Fox et al., 1993; Hurley et al., 2001; Kessler et al., 1993; Larson und Ariano, 1995; Levey et al., 1993; Russell et al., 1992; Weiner et al., 1991; Yung et al., 1995).

Auch D1-Rezeptor-Protein und Bindestellen im GP verschiedener Spezies sind in mehreren Studien beschrieben worden (Camps et al., 1990; Levey et al., 1993; Russell et al., 1992; Weiner et al., 1991), wobei ihre Lokalisation ausschließlich präsynaptisch zu sein scheint (Hurley et al., 2001; Mansour et al., 1990; Yung et al., 1995).

Bei der Ratte liegt die Rezeptor-Dichte für D1- und D2-Rezeptoren des GP im Vergleich zum Striatum etwa um ein Fünftel niedriger, das Verhältnis D1- zu D2-Rezeptoren im GP ist mit ca. 3 identisch mit dem Striatum (Boyson et al., 1986). Beim Menschen ist der Unterschied zwischen GPe und Striatum bezüglich der D2-Rezeptor-Dichte noch wesentlich geringer. Der menschliche GPe hat etwa die Hälfte bis ein Drittel der D2-Rezeptor-Dichte des Striatums (Camps et al., 1990; Kessler et al., 1993).

Im GP der Ratte (Larson und Ariano, 1995) und GPe des Menschen sind D3-Rezeptor-Bindestellen (Gurevich und Joyce, 1999; Murray et al., 1994), D3-Rezeptor-Protein (Quik et al., 2000) und D3-Rezeptor-mRNA (Gurevich und Joyce, 1999) nachgewiesen worden. Der D3-Rezeptor könnte für den GP von besonderer Bedeutung sein, da er eine ungewöhnlich hohe Affinität zu Dopamin hat (Levesque et al., 1992) und somit auch in Kernen mit geringen extrazellulären Dopamin-Konzentrationen aktiviert werden kann.

Sowohl im GP der Ratte als auch des Menschen wurden D4-Rezeptoren nachgewiesen; sie sind postsynaptisch auf GABAergen pallidalen Neuronen lokalisiert (Ariano et al., 1997; Mrzljak et al., 1996). Diesem Rezeptor-Typ wird durch seine Hohe Affinität zu Clozapin, einem besonders wirksamem Antipsychotikum mit bislang unvollständig verstandenem Wirkungsmechanismus (4.3.5), besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Auch Hinweise für die Expression von D5-Rezeptoren auf pallidalen Neuronen und präsynaptischen Strukturen im GP existieren (Bergson et al., 1995; Ciliax et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im GP alle bekannten Dopamin-Rezeptor-Typen in vergleichsweise hoher Dichte exprimiert werden. Leider liegen bislang keine Erkenntnisse über eine präsynaptische Dopamin-Rezeptor-Lokalisation auf nigropallidalen Afferenzen vor. Gesichert ist die präsynaptische Lokalisation von D1-Rezeptoren, die prä- und

postsynaptische Lokalisation von D2-Rezeptoren, sowie die postsynaptische Lokalisation von D3-, D4- und D5-Rezeptoren.

### Enzyme des Dopamin-Katabolismus und des Dopamin-Transports

Im GP der Ratte wurden beide Isoformen des am Dopamin-Abbau beteiligten Enzymes Monoaminoxidase (MAO) MAO-A und MAO-B (4.3.2) mit nur geringfügig geringere Dichte als im Striatum nachgewiesen (Saura et al., 1992). Sowohl der Dopamin-Transporter (DAT), der extrazelluläres Dopamin in die Zelle transportiert (4.3.4) (Meng et al., 1999; Mennicken et al., 1992; Miller et al., 1997; Quik et al., 2000), als auch der vesikuläre Monoamintransporter (VMAT-2), der intrazellulär Dopamin vom Cytoplasma in die Vesikel transportiert (4.3.4), wurden im GP der Ratte bzw. des Menschen nachgewiesen (Miller et al., 1999).

### Neurochemische Befunde für eine Beteiligung von Dopamin an der Neurotransmission im GP

Neurochemische Studien an Hirnschnitten (*Slices*) lassen eine funktionelle Rolle des Dopamins im GP vermuten. Bei der *Slice*-Technik wird ein Schnitt eines nativen und frisch entnommenen Gehirns in eine physiologische Salzlösung überführt. Das Medium wird kontinuierlich ausgetauscht und die darin enthaltenen Transmitter analysiert. Die Reaktion der Transmitterfreisetzung auf zugegebene Pharmaka ermöglicht eine, wenngleich mit Einschränkungen zu interpretierende, neurochemische Charakterisierung des Präparates. Eine wichtige Einschränkung dieser Technik ist, dass nur noch lokale neuronale Verknüpfungen existent sind, da durch den Schnitt viele Afferenzen und Efferenzen durchtrennt sind. Zudem kann oft nur eine durch elektrische oder chemische Reizung (Depolarisation) induzierte Transmitterfreisetzung gemessen werden, da die basale Freisetzung nicht messbar ist.

In derartigen Experimenten wurde beobachtet, dass die Aktivierung von D1-Rezeptoren die Freisetzung von GABA aus pallidalen Schnitten stimuliert (Floran et al., 1990), wohingegen ein D2-Agonist die GABA Freisetzung hemmt (Dayne Mayfield et al., 1996; Floran et al., 1997). Außerdem kann NMDA die durch Depolarisation mit Kaliumchlorid induzierte Freisetzung von Dopamin aus pallidalen Schnitten abschwächen (Shindou et al., 1992).

Diese Studien implizieren eine Freisetzung von Dopamin im GP der Ratte, der eventuell modulatorische Funktionen zugeordnet werden können. Die oben genannten Einschränkungen lassen jedoch kaum eine Übertragung der Ergebnisse auf das intakte Gehirn zu.

Demgegenüber sind Ergebnisse aus Mikrodialysearbeiten (5.5.1) mit weitaus weniger artifiziellen Rahmenbedingungen zu erzielen und lassen daher bessere Rückschlüsse auf *in*

*in vivo* Verhältnisse zu. Der neurochemischer Nachweis einer Dopamin-Freisetzung im GP der Ratte wurde *in vivo* mit Hilfe der Mikrodialyse erbracht (Fuchs, 1999; Hauber und Fuchs, 2000). Dabei konnte die Calciumabhängigkeit nachgewiesen und eine Reaktion auf einen Futterstimulus gezeigt werden.

Diese Befunde belegen eine funktionelle Freisetzung von Dopamin im GP und weisen auf eine modulatorische Rolle pallidalen Dopamins hin.

### Elektrophysiologische Befunde zur Rolle von Dopamin im GP

Eine Reihe elektrophysiologischer Arbeiten an Hirnschnitten oder intakten Tieren belegen, dass Dopamin im GP die Aktivität pallidaler Neurone modulieren kann. Pallidale Neurone zeigen wie viele Neurone der Basalganglien eine rhythmische Veränderung in ihrer Feuerrate (*firing rate*, Frequenz der Aktionspotenziale). Diese Oszillationen haben Frequenzen im Minutenbereich und werden entsprechend *multisecond oscillations (in firing rate)* genannt (Ruskin et al., 1999).

Dopamin moduliert sowohl die Aktivität pallidaler Neurone (Ruskin et al., 1998) als auch die *multisecond oscillations* (Ruskin et al., 1999, 2001). Aufgrund entgegengesetzter Reaktionen auf Dopamin-Rezeptor-Stimulation können zwei Typen von pallidalen Neuronen unterschieden werden (Kelland et al., 1995; Napier et al., 1991). Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Primaten einschließlich des Menschen gemacht, wo systemisch appliziertes Apomorphin, ein unspezifischer Dopamin-Agonist, die Aktivität von Neuronen des GPe verändert (Filion et al., 1991; Hutchinson et al., 1997). Neben der postsynaptischen Wirkung auf die Aktivität pallidaler Neurone ist Dopamin auch in der Lage, über präsynaptische Mechanismen die GABA-Freisetzung im GP zu modulieren (Bergstrom und Walters, 1984; Nakanishi et al., 1985; Querejeta et al., 2001) und so indirekt die Aktivität pallidaler Neurone zu beeinflussen. Dieser Mechanismus spielt vermutlich eine größere Rolle als die postsynaptische Modulation der GP Neurone, da iontophoretisch appliziertes Dopamin auf GP Neurone nur eine moderate Veränderung der neuronalen Aktivität auslöste, während die Co-Applikation mit GABA im Vergleich mit alleiniger GABA Applikation die hemmende Wirkung von GABA abschwächte (Bergstrom und Walters, 1984). Dies steht in Einklang mit der präsynaptisch hemmenden Wirkung von D2-Rezeptoren auf die Freisetzung von GABA im GP aus striatopallidalen Projektionen (s.o.).

Diese Befunde belegen, dass GP Neurone für Dopamin bzw. Dopamin-Rezeptor-Liganden sensitiv sind und mit einer Veränderung ihrer elektrischen Eigenschaften auf Dopamin-Rezeptor-Stimulation reagieren.

### Verhaltenspharmakologische Befunde

Eine lokale Blockade von D1- und D2-Rezeptoren im GP induziert Katalepsie bei der Ratte (Costall et al., 1972; Hauber und Lutz, 1999) und die unilaterale Blockade von D2-Rezeptoren im GP der Ratte mit Haloperidol führt zu *Circling* (Rotationsbewegungen um die eigene Achse) (Costall et al., 1972). Die Tatsache, dass mit einer Dopamin-Rezeptor-Blockade auf pallidaler Ebene ähnlich massive Auswirkungen auf die Motorik zu beobachten sind, wie nach striataler Dopamin-Rezeptor-Blockade, lässt auf eine essentielle Rolle pallidaler Dopamin-Rezeptoren für die Motorik schließen.

Die Induktion des *c-fos* Gens, das zur Gruppe der *immediate-early genes* gehört, wird generell als Marker für veränderte, in der Regel erhöhte, neuronale Aktivität angesehen (Morgan und Curran, 1991). Mit Hilfe immunhistochemischer Techniken ist das Genprodukt, das c-Fos Protein, nachweisbar.

Eine lokale Applikation von D2-Antagonisten führt zu einer c-Fos Expression im GP (Marshall et al., 2001), in Striatum, SNr und EP (Hauber und Lutz, 1999).

Eine Population pallidaler Neurone produziert Preproenkephalin (PPE), ein zu den Endorphinen (endogene Opiate) gehörendes Neuropeptid. Die Expression von PPE mRNA in GP Neuronen steht unter dopaminergem D2-Rezeptor abhängiger Modulation (Schuller et al., 1999).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Blockade pallidaler Dopamin-Rezeptoren beträchtlichen Einfluss auf die Motorik und die Aktivität nachgeschalteter Kerne hat, was die funktionelle Bedeutung von Dopamin in diesem Kern hervorhebt.

### Läsionsstudien

Besonders für die Erforschung degenerativer Veränderungen der dopaminergen Innervation werden Tiermodelle mit neurotoxischen Läsionen des Mittelhirns eingesetzt. Zwei Stoffe werden hierfür häufig verwendet: 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) und MPTP (Alexi et al., 2000). Beide Stoffe wirken toxisch auf dopaminerge Neurone. 6-OHDA ist ein Struktur analogon zu Dopamin und wird dementsprechend vom DAT selektiv in dopaminerge Neurone aufgenommen. Dort führt es über einen Radikalkettenmechanismus (Glinka et al., 1997) zur Zerstörung der Neurone. Es wird ausschließlich lokal, also durch intracerebrale Applikation angewendet, da es nicht über die Blut-Hirn-Schranke gelangen kann und zudem sehr oxidationsempfindlich ist. Läsionen des dopaminergen Systems können durch Infusion des Toxins in die Substantia nigra oder in das aufsteigenden dopaminergen Faserbündel, das

mediale Vorderhirnbündel, erreicht werden. Vor allem bei Primaten wird MPTP angewendet, das von der Monoaminoxidase zu MPP<sup>+</sup>, dem aktiven Metaboliten umgewandelt wird und wiederum selektiv dopaminerge Neurone zerstört. Neben der lokalen Anwendung kann MPTP auch systemisch appliziert werden (Übersicht in Alexi et al., 2000).

In mit MPTP behandelten Affen wurde die TH-Immunreaktivität (Parent und Lavoie, 1993; Parent et al., 1990) und DAT-Dichte (Gnanalingham et al., 1995) als Marker für eine dopaminerge Innervation untersucht und erstaunlicherweise eine relative Unempfindlichkeit pallidaler Bereiche im Gegensatz zu striatalen Arealen bemerkt, was als besondere Eigenschaft einer separaten nigropallidalen Projektion interpretiert wird. Zu einem ähnlichen Ergebnis auf zellulärer Ebene kommen Bezdard et al. (2001), die eine relative Schonung der dopaminergen Innervation pallidaler *border* Zellen (4.2.1) nach MPTP-Behandlung in Makaken beobachten.

Rhesusaffen, die nach MPTP-Läsion mit GDNF (*glial-cell-line-derived neurotrophic factor*) behandelt wurden, zeigten eine Verbesserung ihrer Parkinsonsymptome, wobei die histologische Auswertung der Gehirne ergab, dass eine GDNF-induzierte Regeneration im wesentlichen auf den GP, die Substantia nigra und die VTA beschränkt war und im Striatum keine Regeneration stattfand (Gash et al., 1996). Eine GDNF-induzierte Regeneration der durch MPTP geschädigten dopaminergen Innervation wurde ebenfalls im GP der Ratte beobachtet (Rosenblad et al., 1999; 2000), wobei das Ausmaß nicht ausreichend war, um eine beobachtbare Verbesserung motorischer Defizite zu erzielen.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei mit 6-OHDA läsierten Ratten erzielt. Eine lokale Applikation von Dopamin in den GP war in der Lage, motorische Defizite zum Teil wieder zu beheben (Galvan et al., 2001). Dies zeigt, dass die dopaminerge Innervation des GP von entscheidender Bedeutung für die Symptomatik von Morbus Parkinson sein kann.

Nach einer 6-OHDA Läsion der SN der Ratte wurden im ipsilateralen GP erhöhte GABA-Konzentrationen gemessen, was ebenfalls auf eine direkte Beteiligung pallidalen Dopamins auf die Modulation der Neurochemie in diesem Kern hinweisen könnte (Segovia et al., 1986). Diese Befunde zeigen übereinstimmend, dass neurodegenerative Veränderungen des Dopamin-Systems neben ihren Auswirkungen auf das Striatum auch extrastriatale Bereiche der Basalganglien mitbetreffen. Dies legt eine pathologisch veränderte dopaminerge Innervation des GPe z.B. bei Morbus Parkinson nahe, wie sie in den im folgenden Abschnitt aufgeführten klinischen Befunden bestätigt wurden.

### Klinische Befunde

In *post-mortem* Analysen von Gewebehomogenaten verschiedener Hirnareale an Morbus Parkinson erkrankter Patienten wurde neben einer Abnahme der Dopamin-Konzentration im Striatum (Caudatus und Putamen) um ca. 80% im Vergleich zur Kontrollgruppe eine ebenso starke Abnahme in extrastriatalen Bereichen der Basalganglien festgestellt, wobei der GPe die stärkste Veränderung mit ebenfalls 80% Verlust der Gewebe-Dopamin-Konzentration zeigt (Hornykiewicz, 1998; 2001). Hornykiewicz hält es für sehr wahrscheinlich, dass Dopamin auch in dem Striatum nachgeschalteten Kernen an der Informationsbearbeitung innerhalb der Basalganglien teilnimmt und eine Schädigung des extrastriatalen Dopamins zu den motorischen Defiziten bei Morbus Parkinson beiträgt (Hornykiewicz, 2001). Zu ähnlichen Folgerungen gelangten Ploska et al. (1982).

Außerdem konnte im GPe von Parkinson Patienten eine Verminderung der Dichte des DAT (Miller et al., 1997), des VMAT-2 (Miller et al., 1999), des D1 Rezeptors (Hurley et al., 2001) und der TH-immunoreaktiven Fasern (Jan et al., 2000) nachgewiesen werden.

Bei der Chorea Huntington gibt es ebenfalls Hinweise auf eine Veränderung des dopaminergen Systems in extrastriatalen Bereichen. So ist schon in sehr frühen Stadien gerade im GPe eine verminderte D2- Rezeptor-Dichte vorhanden (Glass et al., 2000). Ob dies zur Symptomatik der Erkrankung nennenswert beiträgt, ist allerdings fraglich, da bei Chorea Huntington striatopallidale Projektionen degenerieren und es sich beim Verlust pallidaler D2-Rezeptoren vermutlich um präsynaptische D2-Rezeptoren auf genau diesen Afferenzen handelt.

Damit bestätigen die klinischen Befunde beim Menschen, dass bei Morbus Parkinson die degenerative Veränderung des Dopaminsystems nicht auf striatale Bereiche beschränkt bleiben, sondern auch extrastriatale Kerne wie den GPe betreffen.

### Zusammenfassung der Befunde zur Rolle von Dopamin im GP

Die in diesem Kapitel vorgestellten Befunde legen den Schluss nahe, dass Dopamin im GP der Ratte und GPe von Primaten einschließlich des Menschen, eine wichtige Rolle spielen könnte. Die anatomischen und neurochemischen Daten zeigen unzweifelhaft eine dopaminerge Innervation, eine funktionelle Freisetzung und die Fähigkeit pallidaler Neurone, auf Dopamin reagieren zu können. Eine Reihe von Hinweisen lassen auch vermuten, dass bei Morbus Parkinson das extrastriatale Dopamin-System der Basalganglien mitbetroffen ist und so die Ursache eines Teils der klinischen Symptome dieser Krankheit sein könnte.



Bislang liegen keine neurochemischen Daten zur Charakterisierung der Dopamin-Freisetzung im GP am intakten Tier vor. Die vorliegende Arbeit soll mit Hilfe der Mikro dialyse und am Tiermodell der Ratte dazu Befunde liefern. Dazu wird nachfolgend die Biochemie und Physiologie von Dopamin besprochen, bevor dann die Technik der Mikro dialyse näher beleuchtet wird.

### 4.3. Dopamin: Biochemie und Physiologie

Dopamin gehört zusammen mit Noradrenalin und Adrenalin zur Gruppe der Catecholamine, die im Gehirn eine zentrale Rolle als Neurotransmitter und Neuromodulator spielen.

#### 4.3.1. Anabolismus

Die Biosynthese von Dopamin erfolgt im Cytoplasma catecholaminerger Neurone aus der Aminosäure L-Tyrosin, die durch das Schlüsselenzym der Catecholaminbiosynthese, die Tyrosin-Hydroxylase (TH), zu L-DOPA umgewandelt wird. Es folgt die Decarboxylierung zu Dopamin, die durch die Dopa-Decarboxylase (DDC, synonym zur Aromatischen Aminosäure Decarboxylase AAD) katalysiert wird. Bei diesem Schritt endet der Syntheseweg im dopaminergen Neuron. In noradrenergen Neuronen schließt sich eine weitere Hydroxylierung, katalysiert durch die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase, an. Schließlich wird in adrenergen Neuronen aus Noradrenalin durch Methylierung Adrenalin synthetisiert. Adrenerge Neurone spielen im peripheren Nervensystem eine wichtige Rolle, im ZNS ist Adrenalin jedoch von untergeordneter Bedeutung.

Das Enzym TH ist in allen catecholaminergen Neuronen enthalten, wohingegen die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase ausschließlich in noradrenergen Neuronen lokalisiert ist. Dies ist bei der Interpretation immunhistochemischer Färbungen der TH (4.3.1) zu beachten.

#### 4.3.2. Katabolismus

Zwei Enzyme sind in erster Linie für den Abbau der Catecholamine verantwortlich: die Monoaminoxidase (MAO) und die Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Die Monoaminoxidase ist in der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert und liegt in zwei Isoformen vor, MAO-A und MAO-B, die sich in ihrer Substratspezifität hinsichtlich anderer Monoamine unterscheiden. Die COMT ist ein cytoplasmatisches Enzym.

Im Falle des Dopamin-Abbaus katalysiert die MAO die Oxidation von Dopamin zu 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC), welche dann von der COMT zu Homovanillinsäure (HVA) methyliert wird (Kruk und Pycock, 1991). DOPAC und HVA sind die Hauptmetabolite des Dopamin-Abbaus. Beide Stoffe liegen extrazellulär in relativ hoher Konzentration vor und sind mit Hilfe der Mikrodialysetechnik (4.5.1) messbar.

Neben den beiden Hauptmetaboliten existieren extrazellulär eine Reihe z.T. nur sehr kurzlebiger metabolischer Zwischenprodukte, auf die hier nicht weiter eingegangen wird.

Allgemein ist festzustellen, dass die Kenntnisse des Dopamin-Anabolismus weitaus tiefer sind als die des Katabolismus, was insbesondere die Interpretation von Messungen extrazellulären DOPACs und HVAs erschwert. Extrazelluläre DOPAC kann aus mehreren Quellen stammen. So kann DOPAC aus vesikulär freigesetztem Dopamin stammen aber auch intrazellulär als Nebenprodukt der Dopamin-Synthese im Cytoplasma gebildet werden und dann über Transportmechanismen in den extrazellulären Raum gelangen. Schließlich können auch Gliazellen am Dopamin-Abbau beteiligt sein.

#### 4.3.3. Dopamin-Rezeptoren

Dopamin-Rezeptoren werden in zwei Familien eingeteilt, die D1- und D2-Rezeptorfamilie. D1-Rezeptoren sind mit G<sub>s</sub>-Proteinen, D2-Rezeptoren mit G<sub>i</sub>-Proteinen gekoppelt, so dass bei Aktivierung der D1-Rezeptoren eine Stimulierung der Adenylatcyclase, bei Aktivierung der D2-Rezeptoren eine Hemmung der Adenylatcyclase resultiert. Eine Aktivierung der Adenylatcyclase führt zur Erhöhung des cytoplasmatischen cAMP Spiegels, einem wichtigen *second messenger*, was letztlich nach weiteren Signaltransduktionsschritten zur Erregung des Neurons führt (Vallone et al., 2000).

Zur Familie der D1-Rezeptoren gehören D1- und D5-Rezeptoren, zur D2-Rezeptor-Familie D2-, D3- und D4-Rezeptoren (Tab. 2). Einige Rezeptor-Typen, wie z.B. der D2-Rezeptor kann in verschiedenen Isoformen vorliegen (Khan et al., 1998; Usiello et al., 2000). Die verschiedenen Rezeptor-Typen zeigen gegenüber ihres physiologischen Liganden Dopamin stark unterschiedliche Affinitäten (Tab. 2).

**Tab. 2:** Übersicht über die bisher bekannten Dopamin-Rezeptor-Subtypen

	D1-Rezeptor-Familie		D2-Rezeptor-Familie		
	D1	D5	D2	D3	D4
Affinität für Dopamin (K <sub>d</sub> , nM) (Strange, 2000)	2340	228	1705	27	450
Wirkung auf Aktivität der Adenylatcyclase	Stimulierung	Stimulierung	Hemmung	Hemmung	Hemmung
Wirkung auf den Erregungszustand des Neurons	Exzitation	Exzitation	Inhibition	Inhibition	Inhibition

### 4.3.4. Dopaminerge Terminale

Am Beispiel einer prototypischen dopaminergen Terminalen sollen kurz wichtige funktionelle Elemente erläutert werden. Ankommende Aktionspotenziale depolarisieren die Terminale was zu einem Einstrom von Calcium-Ionen über spannungsgesteuerte Kanäle führt. Dies wiederum führt zur Fusion von Dopamin-Vesikel mit der präsynaptischen Membran und zur Freisetzung der darin enthaltenen Dopamin-Moleküle in den extrazellulären Raum, wo die Transmitter-Moleküle schließlich an ihre Rezeptoren binden und entsprechende Effekte auslösen. Dabei kann die Wirkung auf die eigene Terminale beschränkt sein (autokrine Wirkung), wenn das freigesetzte Dopamin an präsynaptische Autorezeptoren bindet oder aber postsynaptisch die Aktivität Dopamin-Rezeptor tragender Neurone modulieren. Das Dopamin-Signal wird auf drei verschiedenen Arten zeitlich begrenzt. Entweder wird extrazelluläres Dopamin durch den Dopamin-Transporter (DAT) wieder in die Terminale aufgenommen (*Reuptake*) oder es wird enzymatisch abgebaut (4.3.2) oder aber es diffundiert aus dem Bereich der Terminale und wird so stark verdünnt, so dass keine Rezeptoraktivierung mehr erfolgt. Durch den Wiederaufnahmemechanismus durch den DAT ins Cytosol transportiertes Dopamin kann wiederverwertet werden, indem es erneut in Vesikel „verpackt“ wird. Dieser Transport über die Vesikelmembran geschieht mit Hilfe des vesikulären Monoamintransporters (VMAT) (Übersicht in Masson et al., 1999). Der *Reuptake*-Mechanismus spielt in dopaminerg innervierten Gebieten vermutlich die wichtigste Rolle zur zeitlichen, aber auch räumlichen Begrenzung des Dopamin-Signals (Grace, 1995; Zoli et al., 1998). Ist eine hohe DAT-Dichte in unmittelbarer Umgebung der freisetzenden Terminalen vorhanden, so kann ausgeschüttetes Dopamin nur kurze Strecken diffundieren, bevor es wiederaufgenommen wird. Anders in Arealen mit geringerer DAT-Dichte (wie z.B. dem präfrontalen Cortex (Sesack et al., 1998), wo die freie Diffusionsstrecke und damit auch die biologische Halbwertszeit von freigesetztem Dopamin wesentlich länger ist. Dementsprechend ist gerade für Monoamintransmittersysteme eine eher „offene“ Neurotransmission mit "offenen Synapsen" (Zoli et al., 1998) charakteristisch, bei der die Neurotransmitter auf ihre Zielrezeptoren erst nach längeren Diffusionstrecken durch das Interstitium treffen. Dies wird als Volumentransmission bezeichnet (engl. *volume transmission*) (Agnati et al., 1995). Daher sollte der Begriff 'dopaminerge Synapse' auch mit Vorsicht gebraucht werden, da eine Synapse durch das Vorhandensein einer prä- und postsynaptischen Zelle in unmittelbarer Nähe gekennzeichnet ist. Bei einem Großteil der dopaminergen Terminalen fehlt aber die direkte Nähe zur postsynaptischen Zelle.

Anhand von Modellberechnungen basierend auf experimentellen Daten für extrazelluläre Dopamin-Konzentrationen im Nucleus accumbens, dem ventralen Striatum, kommen Garris et al. (1994) zum Schluss, dass auch auf striataler Ebene die extrasynaptische Wirkung von Dopamin eine größere Rolle spielt als bisher angenommen.

Dementsprechend ist in vielen Terminationsgebiete dopaminerger Afferenzen eine tonische Dopamin-Freisetzung zu beobachten, die entweder aus Varikositäten (Anschwellungen entlang eines Axons, aus denen der Transmitter in den Zellzwischenraum abgegeben wird) oder als "Überlauf" (*spill-over*) aus dem synaptischen Spalt stammen (Garris et al., 1994). Dabei sind die Dopaminspiegel im Extrazellulärraum nicht überall gleich hoch. Vielmehr geht man von einem kugelförmigen Volumen (*sphere of influence*) mit einem Radius von 2  $\mu\text{m}$  (Garris et al., 1994) aus, das vom Dopamin einer Synapse beeinflusst werden kann.

Aus einer Modellrechnung basierend auf den Messungen der Dopamin-Konzentration im NAcc nach elektrischer Stimulierung des medialen Vorderhirnbündels (Garris et al., 1994) sollen einige Zahlen eine quantitative Vortstellung der Dopamin-Freisetzung ermöglichen: Die vesikuläre Dopamin-Konzentration wird entsprechend dieser Brechnung auf 25 mM geschätzt. Nach Freisetzung aus den Vesikeln wird die maximale Dopamin-Konzentration an der postsynaptischen Membran bereits nach 0,5  $\mu\text{s}$  erreicht und liegt bei 1,6 mM. Diese Konzentration ist auf den ersten Blick erstaunlich hoch, geht man von extrazellulären (interstitiellen) Konzentrationen im Bereich von wenigen Nanomolar (nM) aus. Zudem werden pro isoliertem Stimulus (elektrischer Reiz des Vorderhirnbündels, Reizcharakteristika in Garris et al., 1994) nur geschätzte 1000 Dopamin-Moleküle in diese *sphere of influence* abgegeben. Verständlich wird die hohe Konzentration, wenn man das Volumen des synaptischen Spaltes mit ca.  $10^{-18}$  Liter berücksichtigt. Außerhalb des synaptischen Spaltes kann Dopamin innerhalb einer Halbwertszeit theoretisch mit 200 anderen Synapsen die in einem Radius von 10  $\mu\text{m}$  liegen können, interagieren (Zoli et al., 1998). Diese Entfernung ist damit etwa 500 mal länger als die Breite des synaptischen Spaltes (20 nM).

*In vivo* hängt die Menge des ausgeschütteten Dopamins und die maximale Konzentration im Extrazellulärraum neben der Feuerrate, also der Frequenz an Aktionspotenzialen, auch von deren zeitlichem Muster ab. So kann bei gleichbleibender Frequenz (über einen längeren Zeitraum gemittelt) die Dopamin-Freisetzung beträchtlich erhöht werden, wenn kurze Salven (*bursts*) gefolgt von Intervallen ohne Aktionspotenzialen auftreten (Suaud-Chagny et al., 1992). Der tonische und phasische Modus der Dopamin-Freisetzung, die untrennbar miteinander verbunden sind (Grace, 1995), spiegeln auch die Doppelrolle von Dopamin als Neurotransmitter und Neuromodulator wider.

### 4.3.5. *Pharmaka zur Untersuchung dopaminerger Terminalen*

Es gibt eine Vielzahl von Stoffen, die mehr oder weniger spezifisch mit einzelnen Mechanismen einer dopaminerger Terminalen interagieren. Im Folgenden soll nur der grundlegende Wirkmechanismus der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stoffe erläutert werden.

#### Reuptake-Inhibitoren

Wird der DAT blockiert, so kann extrazelluläres Dopamin nicht mehr in die Terminale aufgenommen werden. Es resultiert eine erhöhte extrazelluläre Dopamin-Konzentration. Ein solcher Inhibitor ist Nomifensin (Schacht et al., 1982), das neben dem DAT auch den Wiederaufnahmemechanismus für Noradrenalin hemmt. Cocain, ein Alkaloid aus den Blättern des Coca-Strauches (*Erythroxylon coca*), wirkt auch als *Reuptake*-Hemmer (Grace, 1995; Masson et al., 1999) an dopaminerger Terminalen, wobei es in seiner ursprünglichen therapeutische Anwendung als Lokalanästhetikum verwendet wurde (Übersicht in Ritchie und Greene, 1991). Die Wirkung als Lokalanästhetikum und als Hemmstoff des Catecholamin-*Reuptakes* sind unabhängig voneinander (Kruk und Pycock, 1991) und die Eigenschaften als *Reuptake*-Hemmer spielen im Zusammenhang mit seiner Wirkung als Psychostimulans die größere Rolle (Grace, 1995).

#### Induktoren der präsynaptischen Freisetzung

D-Amphetamin, ein Phenylethylamin wie alle Catecholamine, wird oft stark vereinfacht als *Reuptake*-Inhibitor bezeichnet. Jedoch liegt die eigentliche Wirkung nach Aufnahme über den DAT in die Zelle in der Freisetzung vesikulären Dopamins ins Cytosol, was zu einer erhöhten cytoplasmatischen Dopamin-Konzentration führt (Leviel, 2001; Sulzer et al., 1995). Diese erhöhten cytosolischen Dopamin-Spiegel werden nicht metabolisiert, da D-Amphetamin die MAO reversibel hemmt. Unter diesen Bedingungen kann der DAT nun seine Transportrichtung umkehren und cytosolisches Dopamin freisetzen (Bannon et al., 1995; Cooper et al., 1991; Kruk und Pycock, 1991). Diese Freisetzung ist nicht aktionspotenzialgekoppelt, benötigt keinen Calciumeinstrom und keine Vesikelfusion (Arbuthnott et al., 1990). Auch wenn D-Amphetamin oft als indirekter Dopamin-Agonist bezeichnet wird, so wirkt es analog auch auf noradrenerge und serotonerge Neurone (Hoebel et al., 1989).

### Rezeptor-Liganden

Rezeptor-Liganden können die Wirkung des eigentlichen Transmitters nachahmen oder blockieren. Entsprechend werden sie in Agonisten und Antagonisten eingeteilt. Racloprid und Haloperidol sind D2-Rezeptor-Antagonisten, die sich jedoch in ihrer Selektivität gegenüber anderen Rezeptor-Typen unterscheiden. Während Racloprid ein hochselektiver D2-Rezeptor-Antagonist ist (Hall et al., 1988), hat Haloperidol auch nennenswerte Affinitäten zum D1 Rezeptor (Seeman und Van Tol, 1994), die *in vivo* aber nur eine relativ geringe Rolle spielt (Bubser und Deutch, 2002; Hall et al., 1989). Clozapin hat eine hohe Affinität zum D4 Rezeptor, besitzt daneben aber Affinitäten zu Rezeptoren nahezu aller Transmittersysteme (Coward, 1992; Meltzer, 1994). Haloperidol und Clozapin werden als Neuroleptika (antipsychotisch wirkende Substanzen) eingesetzt, während der therapeutische Nutzen von Racloprid zur Behandlung von psychiatrischen Erkrankungen minimal ist.

### Natrium-Kanal-Blocker

Für die Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotenzialen sind schnelle, spannungsgesteuerte Natrium-Kanäle verantwortlich. Werden sie blockiert, können auch keine Aktionspotenziale mehr gebildet und fortgeleitet werden. Tetrodotoxin (TTX), das Gift des Fugu-Fisches (Habermehl, 1984), ist dazu in geringsten Konzentrationen in der Lage (Kao, 1972). Der Einsatz von TTX kann so zum Nachweis der Aktionspotenzial-Abhängigkeit der Transmitterfreisetzung dienen (Westerink et al., 1987).

## **4.4. Zielsetzung der Arbeit**

Die Aufstellung eines grundlegenden Modells zur Verschaltung und Funktionsweise der Basalganglien (Alexander und Crutcher, 1990) machten Erklärungsversuche pathologischer Veränderungen bei Erkrankungen dieses Systems (Albin et al., 1989) erst möglich und eröffneten neue experimentelle Ansätze zur Behandlung dieser Krankheiten. Durch immer detaillierterer Kenntnisse der Physiologie und Anatomie einzelner Kerne geriet das einfache Modell an seine Grenzen und konnte zentrale Befunde aus der Physiologie und Pathophysiologie der Basalganglien nicht mehr erklären (Levy et al., 1997; Parent und Cicchetti, 1998; Wichmann und DeLong, 1996). Auf der Suche nach einem verbesserten Modell rückte unter anderen ein bis dahin als von untergeordneter Bedeutung eingeordnetes Kerngebiet, der Globus pallidus, in das Zentrum des Interesses zahlreicher Studien. Aufgrund anatomischer und physiologischer Befunde wurde klar, dass dem GP der Ratte bzw. dem GPe

von Primaten einschließlich des Menschen eine weitaus wichtigere Rolle zukommt, als aus dem klassischen Modell der Basalganglien abgeleitet werden kann (Chesselet und Delfs, 1996; Parent und Cicchetti, 1998; Wichmann und DeLong, 1996).

Der GP ist nicht nur ein zwischengeschalteter Nucleus des indirekten Weges, der eine Relais-Funktion hat und dem Striatum nachgeordnet dessen Informationen an die Ausgangsstrukturen der Basalganglien weitergibt. Vielmehr scheint der GP in einer Schlüsselposition zu sein, aus der er die Gesamtaktivität der Basalganglien steuern kann. So unterhält er Verbindungen zu nahezu allen Kernen der Basalganglien (Parent und Cicchetti, 1998; Parent und Hazrati, 1995). Auf zellulärer Ebene kontaktieren pallidale Terminalen Neurone der Ausgangsstrukturen in einer dem Zellkörper näheren (proximalen) Position im Vergleich zu anderen Afferenzen (Parent et al., 2000; Smith und Bolam, 1991; 4.2.1), wodurch pallidale Afferenzen im Vergleich zu anderen einen stärkeren Einfluss auf die neuronale Aktivität ausüben können. Dadurch sind die anatomischen Voraussetzungen für eine strategisch exzellente Position des GP innerhalb des Netzwerks der Basalganglien gegeben. Die Tatsache, dass die neuronale Konvergenz in den Basalganglien (Bergman et al., 1998, Oorschot, 1996) gerade auf der Stufe der striatopallidalen Projektion, wo der Großteil von ca. 2,79 Millionen striatalen Neurone auf etwa 46.000 Neurone des GP konvergiert (4.1.2), besonders stark ausgeprägt ist, macht deutlich wie stark kondensiert die im GP repräsentierte Information sein muss. Eine Modulation auf pallidaler Ebene kann daher vielleicht mehr als auf striataler Ebene die Aktivität der Basalganglien massiv beeinflussen. Bisher kaum untersucht und in diesem Zusammenhang vermutlich von großer Bedeutung ist die Rolle des Dopamins in Regionen außerhalb des Striatums, also in sogenannten „**extrastriatalen Strukturen**“ wie z.B. dem GP. Alle anatomischen und physiologischen Befunde sprechen für eine funktionelle Neurotransmission durch Dopamin sowohl im GP der Ratte als auch im GPe von Primaten einschließlich des Menschen (4.2.3). Entsprechende neurochemische Messungen im intakten Tier fehlten bislang aber weitgehend. Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit bestand daher in der neurochemischen und anatomischen Charakterisierung der dopaminergen Innervation des GP der Ratte.

Dabei sollten in erster Linie folgenden Fragen beantwortet werden:

- Wie wirkt sich eine Zerstörung des Ursprungsgebietes dopaminergener Neurone auf die dopaminerge Innervation des GP aus ?
- Existieren innerhalb des GP Unterschiede in der Morphologie der dopaminergen Innervation ?



- Wird Dopamin, das mit Hilfe der Mikrodialyse im GP der Ratte gemessen wird, dort aktionspotenzialgekoppelt ausgeschüttet ?
- Verändern biologisch relevante, aversive und belohnende Stimuli die Dopamin-Freisetzung im GP ?
- Ist das Ausmaß der Dopamin-Freisetzung auf pharmakologische Stimuli im GP vergleichbar mit striatalen Arealen ?
- Wird die Dopamin-Freisetzung im GP durch andere, für den GP relevante Transmittersysteme, wie Glutamat, GABA und Acetylcholin reguliert ?
- Ist die durch nebenwirkungsarme und –starke Neuroleptika hervorgerufene Dopamin-Freisetzung im GP unterschiedlich, d.h. lassen sich aufgrund der pallidalen Dopamin-Freisetzung Voraussagen über deren Nebenwirkungspotenzial treffen ?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden vor allem zwei Methoden eingesetzt: Die *in vivo* Mikrodialysetechnik und die Immunhistochemie.

Da es sich bei der Mikrodialysetechnik und vor allem bei der damit verbundenen hochsensitiven Analytik mittels HPLC um eine sehr anspruchsvolle, aufwendige und anfällige Technik handelt, wird nachfolgend eine Einführung in Prinzip, Leistung und Grenzen dieser Methodik gegeben. Auch wenn ein Großteil der grundlegenden Methodenetablierung bereits geleistet war, so spielte im Rahmen dieser Arbeit die weitere Verbesserung der Mikrodialysetechnik und HPLC-Analytik eine nicht unerhebliche Rolle. Praktische Erfahrungen, die dabei als bedeutend für eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit dieser Techniken erachtet wurden, sind unter 5.5 dokumentiert.

## 4.5. Methodik

### 4.5.1. Mikrodialyse

Methodischer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die *in vivo* Mikrodialysetechnik am frei beweglichen, wachen Tier. Nachfolgend sollen Prinzip, Leistung und Grenzen der Methodik angesprochen werden und einige praktische Aspekte des Einsatzes dieser Technik erläutert werden.

Wie der Name schon sagt, beruht die Mikrodialysetechnik auf dem Prinzip der Dialyse. Die Dialyse ist ein physikalisches Verfahren zur Auftrennung gelöster Teilchen in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße und Ladung durch Diffusion durch eine semipermeable Membran. Die treibende Kraft ist der Konzentrationsgradient, der für die einzelnen Stoffe über der Membran liegt. Es kommen die gleichen Dialyse-Membranmaterialien zum Einsatz, wie sie auch in der Hämodialyse („Blutwäsche bei Nierenkrankheiten“) verwendet werden, allerdings sind alle Bestandteile eines Mikrodialysesystems miniaturisiert, was durch die Vorsilbe ‚mikro‘ zum Ausdruck gebracht wird. Die erste experimentelle Anwendung einer Dialysmembran im Gehirn eines Säugetiers wurde von Bito et al. (1966) durchgeführt. Dabei wurde ein Membransäckchen in das Gehirn von Hunden implantiert und nach einigen Stunden Verweilzeit wieder entfernt und dessen Inhalt auf die darin gelösten „dialysierten“ Aminosäuren untersucht. Diese Idee wurde von Ungerstedt aufgegriffen und am Vorbild eines Blutgefäßes weiterentwickelt (Ungerstedt und Pycocock, 1974): anstatt ein flüssigkeitsgefülltes Membransäckchen in das Gehirn zu implantieren, wurde die Membran nun in Form einer Sonde ins Gehirn eingebracht und mit einer Perfusionsflüssigkeit kontinuierlich durchspült. Die Ergebnisse der Analyse des aufgefangenen Dialysates können dann in zeitlichen Zusammenhang zum Verhalten des Tieres oder zu Manipulationen wie Applikation von Pharmaka gesetzt werden. In der Tat ähnelt ein derartig durchspülter Membranschlauch einem Blutgefäß, da der Stofffluss in beiden Richtungen, also auch aus dem Perfusat ins Gewebe möglich ist. Man spricht dann von der reversen Mikrodialyse, mit Hilfe derer Stoffe, die ins Perfusat gegeben werden, lokal in unterschiedliche Gehirnregion appliziert werden und gleichzeitig Reaktionen von Stoffen, die ins Dialysat gelangen, verfolgt werden können. Prinzipiell können mit dieser Technik alle wasserlöslichen Stoffe des an die Sonde angrenzenden extrazellulären bzw. interstitiellen Raumes, deren Molekulargewichts bzw. Größe unterhalb eines Grenzwertes, für den die Membran noch permeabel ist (*cut-off*), liegt, untersucht werden.

Die Technik kann prinzipiell in nahezu allen Gewebetypen eingesetzt werden und hat eine weite Verbreitung gefunden, wobei der überwiegende Teil die Anwendung der Mikrodialyse im Gehirn, die sogenannte intracerebralen Mikrodialyse, ausmacht. Die Untersuchung der Neurotransmission des Zentralnervensystems ist damit das wichtigste Einsatzgebiet der Mikrodialyse (ca. 7700 Artikel unter dem Schlagwort 'microdialysis' in Medline<sup>2</sup> veröffentlicht, wovon knapp 6000 auch mit dem Schlagwort 'brain' verknüpft sind, Stand 13.08.02).

So einfach das Prinzip der Mikrodialyse ist, so komplex sind die zu Grunde liegenden biophysikalischen Eigenschaften der Transportprozesse, auf die hier, sofern nicht von direkter Relevanz für die Interpretation der Ergebnisse, nicht weiter eingegangen wird.

#### 4.5.2. Welchen Aspekt der Neurotransmission misst die Mikrodialyse ?

Neurotransmission spielt sich nicht nur im synaptischen Spalt ab, sondern erfolgt auch über weitere Diffusionstrecken im Zellzwischenraum (Interstitium). Man spricht dann von einer Volumentransmission (*volume transmission*, Agnati et al., 1995), die gerade bei den Monoaminen einen wichtigen Transmissionsmodus darstellt (4.3.4). Daneben diffundiert auch bei der „geschlossenen“ *wiring transmission* (Agnati et al., 1995) ein Teil der Transmitter aus dem synaptischen Spalt in das Interstitium. Auch dieser „Überlauf“ (*spill-over* oder *overflow*) spiegelt dann in gewissem Maße Neurotransmission im synaptischen Spalt wieder und ist somit der Mikrodialyse zugänglich.

Aufgrund der komplexen Transportprozesse in der Mikroumgebung der Sonde (Parsons und Justice, 1994) muss davon ausgegangen werden, dass die Mikrodialyse ein verzerrtes Bild der tatsächlichen Vorgänge liefert. Die Ergebnisse sollten mehr qualitativ als quantitativ betrachtet werden und ein quantitativer Vergleich zweier Mikrodialysestudien ist nur möglich, wenn die Rahmenbedingungen (Zusammensetzung des Perfusates, Sondentyp, Perfusionsflussrate etc.) identisch sind. Aus diesem Grund ist es bei der Darstellung der Ergebnisse, die mit Hilfe der Mikrodialyse erzielt wurden, gebräuchlich, die prozentualen Änderungen der Konzentrationen der untersuchten Stoffen bezogen auf ihre Basalwerte darzustellen. Um absolute Konzentrationen interstitieller Stoffe zu ermitteln, müssen besonders aufwendige Verfahren der quantitativen Mikrodialyse eingesetzt werden (Lönnroth et al., 1987; Morrison et al., 1991; Olson und Justice, 1993; Parsons und Justice, 1994).

---

<sup>2</sup> <http://www.nlm.nih.gov/>

Aktionspotenziale und synaptische Transmission spielen sich in Millisekunden ab. Demgegenüber erreicht die Mikrodialyse maximal Minutenauflösung. Außerdem liegen Tausende von Synapsen bzw. Terminalen im Einflussbereich einer Sonde, über die gemittelt wird. Die Mikrodialyse liefert also ein zeitlich und räumlich summiertes Abbild der Neurotransmission im Zellzwischenraum (Interstitium) und ist daher zur Untersuchung offener Synapsen im Sinne der Volumentransmission besonders gut geeignet, erfasst aber auch einen gewissen Anteil der Neurotransmission geschlossener Synapsen.

### 4.5.3. Leistungsfähigkeit und Grenzen der Mikrodialyse

Die Stärke der Mikrodialysetechnik ist die Beprobung des extrazellulären bzw. interstitiellen Raumes von Geweben, im Falle des Gehirns also des Kompartiments, in dem sich die Neurotransmission abspielt. Die Messung kann *in vivo*, also im weitgehend intakten Organ und am wachen Tier durchgeführt werden. Artefakte durch Narkose können somit ausgeschlossen werden und im Gegensatz zur *Slice*-Technik (4.2.3) verfügt das untersuchte Areal über seine physiologischen Afferenzen und Efferenzen. Die Selektivität gegenüber den aufzunehmenden Molekülen ist sehr gering und praktisch nur durch die Permeabilität der Dialysemembran begrenzt. Ist die entsprechende Analytik vorhanden, können also eine weite Reihe von Stoffen gemessen werden. Dies ist mit anderen Techniken, wie z.B. der *in vivo* Voltammetrie nicht möglich. Die *in vivo* Voltammetrie ist ein Verfahren bei dem eine Redox-Elektrode direkt ins Gewebe eingebracht wird und ähnlich den Vorgängen bei der elektrochemischen Detektion (4.5.4) elektrische Ströme, die bei der Oxidation und Reduktion interstitieller Stoffe entstehen, gemessen und mit den interstitiellen Konzentrationen elektroaktiver Substanzen korreliert werden. Im Unterschied zu Gewebehomogenaten, bei denen nicht zwischen extra- und intrazellulärer Herkunft der darin gelösten Stoffe unterschieden werden kann, wird mit der Mikrodialyse nur der Zellzwischenraum beprobt.

Ein weiterer Vorteil der Mikrodialyse ist die schon erwähnte Möglichkeit der lokalen Applikation von Pharmaka mittels reverser Dialyse. Außerdem ist das Dialysat durch eine physikalische Barriere von Enzymen des Transmittermetabolismus abgeschottet, so dass kein weiterer Abbau der Dialysatbestandteile durch im Gewebe vorliegende Enzyme stattfinden kann.

Durch die Verwendung eines Systems mit Führungskanülen (5.5.1 und Abb. 10) kann der operative Eingriff von der eigentlichen Messung zeitlich entkoppelt werden, so dass der Operations- bzw. Narkosestress nicht mehr zur Beeinflussung der Ergebnisse führt. Die

Messung selbst erfolgt am wachen Tier mit minimalen Einschränkungen der Bewegungsfreiheit.

Nicht zuletzt trägt die Mikrodialyse dazu bei, tierexperimentelle Forschung effizienter zu machen. Während z.B. zur Erstellung eines zeitlichen Profils für den Spiegel eines Stoffes im Gehirn bei Verwendung von Gewebehomogenaten mehrere Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet werden müssen, kann das Profil mit Hilfe der Mikrodialyse an einem einzigen Tier gemessen werden, bei ungleich mehr Eingriffsmöglichkeiten, wie der lokalen Applikation von Pharmaka mit reverser Mikrodialyse. Zur statistischen Absicherung müssen in beiden Fällen Mehrfachbestimmungen durchgeführt werden, jedoch werden bei der Mikrodialyse über den ganzen Messzeitraum die gleichen Tiere verwendet.

Aufgrund der Größenverhältnisse (Membrandurchmesser: einige hundert Mikrometer vs. Breite des synaptischen Spaltes: einige Nanometer) ist es auch mit der Mikrodialysetechnik nicht möglich, den synaptischen Spalt direkt zu beproben. Hierzu existiert bis heute kein Verfahren.

Nachteile der Technik sind neben hohen Anforderungen an die praktische Durchführung (5.5) die zeitliche und räumliche Auflösung. Aktionspotenziale und synaptische Transmission spielen sich in Millisekunden ab. Demgegenüber erreicht die Mikrodialyse maximal Minutenauflösung. Kleine Kerngebiete im Gehirn von Nagern sind in ihrer räumlichen Dimension oft nicht größer als eine herkömmliche Mikrodialysesonde und können so durch das Einsetzen einer Sonde nennenswert geschädigt werden. Außerdem liegen Tausende von Synapsen bzw. Terminalen im Einflussbereich einer Sonde, die sich in ihren individuellen Eigenschaften und Freisetzungverhalten der Neurotransmitter durchaus unterscheiden können.

### 4.5.4. Analytik mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Analytik des aufgefangenen Dialysates stellt die eigentliche methodische Schwierigkeit bei der Mikro dialysetechnik dar. Zum einen sind die Konzentrationen des Transmitters im Gegensatz zu seinen Metaboliten extrem gering, was sich in entsprechend geringen Konzentrationen im Dialysat widerspiegelt. Zum anderen liegen im Interstitium eine Vielzahl gelöster Stoffe vor, die die Analytik stören können. Schließlich haben die einzelnen Dialysatfraktionen nur Volumina von einigen Mikrolitern, was eine Mehrfachmessung oder nachträgliche Aufkonzentrierung der Proben ausschließt. Am gebräuchlichsten zur Analyse von Dialysaten der intracerebralen Mikro dialyse ist die HPLC<sup>3</sup>. Diese ist ein unter hohem Druck arbeitendes Chromatographie-System, das ein komplexes Stoffgemisch aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen seiner Bestandteile mit der stationären Phase der Trennsäule in einzelne Stoffe auftrennt. Diese werden dann kontinuierlich in der nachgeschalteten Detektion quantifiziert. Dabei kann der Detektor nicht oder nur bedingt einzelne Stoffe unterscheiden, so dass Trennung und Detektion eine funktionelle Einheit bilden.

Für die Analyse von Dialysaten bietet sich ein wässriges System an. Zur Trennung der Catecholamine und Metabolite wird meist eine Umkehrphasen- oder RP-Chromatographie (von engl. *reversed phase*) eingesetzt, d.h. die stationäre Phase (Füllmaterial der Säule) ist weniger polar als die mobile Phase (Eluent). Die am häufigsten verwendete stationäre Phase ist ein chemisch gebundenes Octadecylsilan (ODS, ein n-Alkan mit 18 Kohlenstoffatomen).

Bei der RP-Chromatographie eluieren polare Stoffe schneller als unpolare. Die meisten Catecholamine und viele ihrer Metabolite liegen bei saurem pH in ionischer Form (Kation) vor, sind also extrem polar und würden damit zu schnell eluieren. Um trotzdem eine Trennung zu ermöglichen, gibt man dem Eluenten ein Ionenpaarreagenz zu. Dieses bildet dann mit Analyt-Ionen ein wesentlich unpolares Ionenpaar, das mit Hilfe der Umkehrphase chromatographiert werden kann. Diese Kombination wird dann als RP-Ionenpaar- oder RP-IP-Chromatographie bezeichnet.

Für die Detektion macht man sich die Elektroaktivität der Stoffe zu Nutze. Catecholamine haben die Eigenschaft, dass sie in Abhängigkeit einer angelegten Spannung oxidiert oder reduziert werden können. Diese Reaktion ist reversibel. Ist in einer elektrisch leitenden

---

<sup>3</sup> high pressure/performance liquid chromatography= Hochleistungs- oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Lösung ein oxidierbarer Stoff in ausreichender Konzentration enthalten und liegt eine genügend hohe Oxidationsspannung (üblicherweise mit positivem Vorzeichen symbolisiert) an, so fließt ein elektrischer Strom, wenn der Stoff in der Nähe der Messelektrode oxidiert. Dieser Strom wird gemessen und in einem weiten Bereich ist die Stromstärke der Konzentration des Stoffes proportional. Der Detektor wird der Trennsäule nachgeschaltet und zeichnet so kontinuierlich Signale (*Peaks*) auf, die dann in Form eines Chromatogramms auswertbar sind. Die Stoffmenge kann durch Vergleich der Peakfläche bzw. Peakhöhe Standards bekannter Konzentration ermittelt werden. Die HPLC Analytik erfasst zunächst nur eine Stoffmenge pro Injektion in das System. Dabei ist das Ergebnis theoretisch unabhängig vom eingesetzten Injektionsvolumen. Erst nach Berücksichtigung des Injektionsvolumens lässt sich dann eine Konzentration errechnen.

Ein Zahlenbeispiel soll die Anforderung an die Sensitivität der Detektion veranschaulichen:

Geht man von einer extrazellulären Dopamin-Konzentration von 5 nM und einer relativen *Recovery*<sup>4</sup> der Sonde von 12% aus, so ergibt sich im Dialysat eine Konzentration von 0,6 nM<sup>5</sup>. Werden 20 µl in das HPLC System injiziert, so entspricht das im Fall von Dopamin einer Stoffmenge von ca. 1,8 pg ( $1,8 \cdot 10^{-12}$  g). Um dieselbe Konzentration durch Lösen von 1,8 g Dopamin (entsprechend etwa einem halben Stück Würfelzucker) in Wasser herzustellen, müsste diese Stoffmenge in ca. 13 gefüllten Schwimmbecken (50m x 10m x 3m) bzw. 20.000 m<sup>3</sup> Wasser gelöst werden. Eine Stoffmenge von 1,8 pg Dopamin erzeugt je nach genauer HPLC-Konfiguration maximale Ströme von einigen Picoampere (pA). Dies ist nur etwa ein Hundertmilliardstel der Stromaufnahme einer Glühbirne (0,1 A). Diese minimalen Ströme müssen soweit verstärkt und vom Hintergrundrauschen abgetrennt werden, dass ein deutliches Detektorsignal (*Peak*) zu messen ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mikrodialyse-Technik in Kombination mit der nachgeschalteten HPLC-Analytik eine äußerst leistungsfähige Methode ist, um die Neurotransmission am intakten Gehirn zu untersuchen. Sie hat dementsprechend in den letzten Jahren eine große Verbreitung in der Neurobiologie gefunden. Die Etablierung als Standardmethodik wird jedoch durch die großen Anforderungen an die praktische Umsetzung und durch die relative hohen Kosten der Technik erschwert.

---

<sup>4</sup> Die relative *Recovery* bezeichnet den prozentualen Anteil der Konzentration eines Stoffes im Dialysat relativ zum umgebenden Medium, in dem die Mikrodialyse stattfindet.

<sup>5</sup> Dieses Zahlenbeispiel geht von der vereinfachten Annahme aus, dass die *in vitro* recovery der *in vivo* recovery entspricht. Dies ist unter den meisten experimentellen Bedingungen nicht der Fall !

## **5. Durchgeführte Arbeiten**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche an Wirbeltieren wurden nach § 8 des Tierschutzgesetzes und die Mitwirkung von Holger Fuchs nach § 9 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vom Regierungspräsidium Stuttgart genehmigt (Az. 35-9185.81/135).

Nachfolgend sind die zur Veröffentlichung eingereichten Manuskripte eingebunden. Die darin zitierte Literatur und verwendeten Abkürzungen sind im entsprechenden Anhang der jeweiligen Arbeit aufgeführt.

### **5.1. Dopaminergic Innervation of the Rat Globus Pallidus Characterized by In Vivo Microdialysis and Immunohistochemistry**

S. 49-72

### **5.2. Effects of Physiological and Pharmacological Stimuli on Dopamine Release in the Rat Globus Pallidus**

S. 73-93

### **5.3. Increased dopamine after reverse microdialysis of NMDA and AMPA in the rat globus pallidus**

S. 94-102

### **5.4. Changes in extracellular dopamine in the rat globus pallidus induced by typical and atypical antipsychotic drugs**

S. 103-120



**Dopaminergic Innervation of the Rat Globus Pallidus**  
**Characterized by In Vivo Microdialysis and**  
**Immunohistochemistry**

H. Fuchs and W. Hauber

Abteilung Tierphysiologie, Biologisches Institut

Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57

D-70550 Stuttgart, Germany

Correspondence to: Dr. W. Hauber; Abt. Tierphysiologie, Biologisches Institut, Universität  
Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70550 Stuttgart; Germany; Phone: +49-711-685-5003, Fax:  
+49-711-685-5090; E-Mail: [Hauber@po.uni-stuttgart.de](mailto:Hauber@po.uni-stuttgart.de)

Running title:

## Dopamine in the rat globus pallidus

### Abbreviations

aCSF	artificial cerebrospinal fluid
DA	dopamine
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid
GABA	gamma-aminobutyric acid
GP	globus pallidus
5-HIAA	5-hydroxyindole-3-acetic acid
HVA	homovanillic acid
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
6-OHDA	6-hydroxydopamine
PBS	phosphate buffered saline
S.E.M.	standard error of the mean
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline with Triton X-100
TH	tyrosine hydroxylase
TH-ir	tyrosine hydroxylase immunoreactive
TTX	tetrodotoxin
VMAT2	vesicular monoamine transporter 2

Macrolon, Ethrane, Vectastain Elite, CD and DPX are registered trademarks

**Abstract-** There is growing evidence that the globus pallidus plays a crucial role in motor control of the basal ganglia. One aspect which has been largely neglected is the significance of its dopaminergic innervation by afferents arising from the substantia nigra pars compacta. The present study was sought to characterize the dopaminergic innervation of the rat globus pallidus by *in vivo* microdialysis and immunohistochemistry in more detail. The dopaminergic input to the globus pallidus was analyzed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in order to i) characterize the dopaminergic innervation pattern with regard to possible morphological differences along the rostrocaudal axis of the globus pallidus and ii) to investigate effects of nigral cell loss on tyrosine hydroxylase immunoreactive fibre density at the pallidal level after unilateral infusion of 6-hydroxydopamine into the substantia nigra. Results reveal a correlation between the extent of the lesion in substantia nigra and the loss of catecholaminergic fibre density in the globus pallidus. Furthermore, two fibre classes were distinguished morphologically which showed a heterogenous distribution along the rostrocaudal axis in the globus pallidus. Using *in vivo* microdialysis we provide neurochemical data to ascertain that dopamine measured in this nucleus is of neuronal origin. Perfusion of tetrodotoxin induced a strong and transient decrease of pallidal dopamine as well as of the main metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid. In conclusion our microdialysis experiment showing a tetrodotoxin-sensitivity of pallidal dopamine demonstrates the functional significance of the nigropallidal dopaminergic innervation. Furthermore, the experiment with 6-hydroxydopamine lesions confirms that degenerative loss of nigral dopaminergic cell bodies also affects the dopamine input of extrastriatal structures such as the globus pallidus. Together, the data imply that defective dopaminergic transmission in the globus pallidus might contribute to motor symptoms induced by experimental damage to the ascending dopamine system or by its degeneration as in Parkinson's disease.

**Key words:** substantia nigra, dopamine, 6-hydroxydopamine, tyrosine hydroxylase, tetrodotoxin, fibres

In current models of the functional organization of the basal ganglia, the globus pallidus (GP) is considered as a major relay nucleus of the indirect pathway linking the caudate-putamen with the output structures of the basal ganglia, i.e. the nucleus entopeduncularis and the substantia nigra pars reticulata in the rat (Chesselet and Delfs, 1996). The GP sends prominent GABAergic projections to the entopeduncular nucleus, substantia nigra pars reticulata, subthalamic nucleus and reticular thalamic nucleus as well as to the pedunculopontine nucleus (Moriizumi and Hattori, 1992; Parent and Hazrati, 1995a; Parent and Hazrati, 1995b). Major pallidal afferents using GABA as transmitter originate in the caudate-putamen, while glutamatergic afferents arise from the subthalamic nucleus (Parent and Hazrati, 1995a; Parent and Hazrati, 1995b) and the parafascicular nucleus (Feger, 1997).

The GP also receives a dopaminergic innervation by collaterals of nigrostriatal fibres as shown in rats (Fallon and Moore, 1978; Lindvall and Björklund, 1979), primates (Sato et al., 2000) and humans (Cossette et al., 1999). There is recent evidence for two morphologically different types of nigrostriatal axons, one that arborizes profusely in the striatum and poorly in extrastriatal nuclei as the GP and another that behaves conversely (Cossette et al., 1999). In the GP tyrosine hydroxylase immunoreactive (TH-ir) fibres form possible synaptic contacts with pallidal neurons (Arluison et al., 1984; Zaborszky and Cullinan, 1996). Furthermore, dopamine (DA) D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors are expressed in the GP of several species (Camps et al., 1990; Richfield et al., 1987). D<sub>2</sub> receptors are located postsynaptically on pallidal neurons (Mansour et al., 1990). In addition, D<sub>2</sub> receptors are also found on striatal axons in the rat GP suggesting that they may also act as pre-synaptic receptors (Mansour et al., 1990; Yung et al., 1995). Electrophysiological and neurochemical data provide consistent evidence that the DAergic innervation of the GP is functional. DA is believed to play a primary role among monoamines in modulating firing rates and patterns of pallidal neurons (Ruskin et al., 2001; Ruskin et al., 1999). According to their electrophysiological response to DA receptor stimulation pallidal neurons can be subdivided in two types (Kelland et al., 1995). Data from slice preparations of the rat GP reveal that DA modulates the release of pallidal GABA acting through D<sub>1</sub> (Floran et al., 1990) and D<sub>2</sub> (Floran et al., 1997) receptors. Moreover, intra-GP infusion of the D<sub>2</sub> receptor antagonist sulpiride induced c-Fos expression in pallidal neurons (Marshall et al., 2001) and in nuclei downstream the GP (Hauber and Lutz, 1999a, but see Marshall et al., 2001). In addition, DA in the GP might play an important role in motor control as local infusions of D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptor antagonists produce akinesia in rats (Hauber and Lutz, 1999b). Intra-GP DA infusions, in turn, were able to partially restore motor deficits in a rat model of Parkinson's disease (Galvan et al., 2001). Likewise, glial-cell-line-derived

neurotrophic factor (GDNF) induced sprouting of DAergic axons in the external GP and substantia nigra of parkinsonian primates have been correlated with functional recovery of motor symptoms (Gash et al., 1996). Accordingly, in the external GP of Parkinson's patients there is a massive reduction of TH-ir fibres (Jan et al., 2000), a reduced pallidal tissue content of DA and its main metabolites homovanillic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) (Hornykiewicz, 1998; Ploska et al., 1982) and a decreased vesicular monoamine transporter (VMAT2) immunoreactivity (Miller et al., 1999). Thus, DA dysfunction in the external GP has been suggested to contribute to hypokinesia in this disease (Hornykiewicz, 1998).

The present experiments were designed to analyze the DAergic innervation of the rat GP by *in vivo* microdialysis and immunohistochemistry in more detail.

Using TH-immunohistochemistry the DA innervation to the GP was analyzed in order to i) to characterize the DAergic innervation pattern with regard to possible morphological differences along the rostrocaudal axis of the GP and ii) to investigate effects of nigral cell loss on tyrosine hydroxylase immunoreactive fibre density at the pallidal level after unilateral infusion of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the substantia nigra. Using microdialysis, we already showed that extracellular DA in the rat GP is calcium-dependent, depolarization-inducible and responsive to salient stimuli, e.g. food (Hauber and Fuchs, 2000). The present *in vivo* microdialysis experiment was performed to ascertain that pallidal DA is of neuronal origin. To this end we measured pallidal DA levels during a local blockade of the fast voltage-gated Na<sup>+</sup>-channels with tetrodotoxin (TTX).

## **Experimental Procedures**

### *Subjects*

Male CD rats (Charles River, Sulzfeld, Germany) were used for all experiments and housed in groups up to five animals in transparent macrolon cages (type IV; 35 x 55 x 10 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany). Animals used for microdialysis were housed individually after surgery in macrolon cages (type III; 37 x 21 x 30 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) with raised solid-walled lids. Temperature (20±2°C) and humidity (50±10%) were kept constant in the animal house and a 12:12-h light-dark schedule was maintained. Rats were given *ad*

*libitum* access to water, food (standard maintenance chow, Altromin, Lage, Germany) was restricted to 15 g per animal and per day.

6-OHDA lesion of the substantia nigra and tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry  
*6-OHDA lesion.* For stereotaxic surgery, animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) following pretreatment with atropine sulphate (0.5 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and secured in a Kopf stereotaxic apparatus (Kopf Instruments, Tujunga, USA). Eight animals weighing 240-300 g received unilateral microinfusions into the substantia nigra. 15 µg 6-OHDA (calculated as free base, 6-OHDA hydrobromide, Sigma, Taufkirchen, Germany) dissolved in sterile saline (Fresenius, Taunusstein, Germany) and containing 0.1 % ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) in 2 µl were infused over 4 min with the infusion cannula (26 g stainless steel) left in position for additional 5 minutes. The 6-OHDA solution was prepared freshly, kept dark and on ice prior to use. The coordinates (Paxinos and Watson, 1986)(tip of injection cannula) were: AP -5.3 mm, L 2.0 mm either on the left or right hemisphere, V -7.6 mm (from skull surface at bregma).

*Histology.* Histological analysis was performed on all animals (n=8) bearing nigral 6-OHDA lesions. In addition, untreated animals (n=3) were included for the morphological analysis of different DA fibre types. Lesioned animals were analyzed 4 weeks after 6-OHDA infusion. They were deeply anaesthetized with Ethrane (Abbot, Wiesbaden, Germany) and perfused transcardially with 200 ml PBS containing 100 mg/l heparin (Merck, Darmstadt, Germany) followed by 200 ml fixative (4% paraformaldehyde in PBS). The brains were dissected and postfixed for about 3 h, immersed in 0.2 M phosphate buffer for one day and then transferred in 30 % sucrose in 0.1 M phosphate buffer for at least 2 days. Brains were processed for TH-immunohistochemistry within one week after fixation.

Cryosections (40 µm) were cut on a freezing microtome (Jung Frigocut, Leica, Nussloch, Germany) and processed for TH immunohistochemistry according to a protocol for free floating sections. First they were washed in 0.05 M Tris buffered saline (TBS, 6.1 g Tris Base and 9 g NaCl in 1 l of demineralized water, pH adjusted to 7.6 with HCl) incubated for 20 min in 50% ethanol with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in water and then blocked for 45 min in 12 % normal horse serum (Vector Laboratories, Burlingame, USA) in TBS containing 0.5 % Triton X-100 (TBS-T). Sections were incubated overnight at 4°C in primary antibody (mouse, anti-TH, antibody

code LNC1, DiaSorin, Stillwater, USA, 1:7500 in TBS-T containing 2 % normal horse serum), then for 1 h at room temperature in secondary antibody (horse, anti-mouse IgG, Vector, Burlingame, USA, 1:200 in TBS-T containing 2 % normal horse serum) and for 1 h at room temperature in ABC complex (1:500 in TBS-T, Vectastain Elite ABC Kit, Vector). Finally the sections were reacted with DAB. TBS-T washing (3 x 10-15 min) was performed between each step. The sections were mounted on coated slides, dried overnight, dehydrated in ascending concentrations of ethanol, cleared in xylene, embedded in DPX (Serva, Germany) and cover-slipped.

*Morphological analysis and data evaluation.* Digital images of stained sections at the nigral (approx. -5.3 posterior to bregma) and two pallidal (approx. -1.3 for the rostral and -1.8 for the caudal portion of the GP) levels were captured using an Olympus AX70 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at different magnifications and a 3CCD color video camera with a resolution of 752 (horizontal) x 582 (vertical) effective picture elements (Model DXC-950P, Sony, Tokyo, Japan). All measurements were performed using AnalySis 3.0 software (Soft Imaging Systems, Münster, Germany).

For assessing the extent of the nigral lesion a polygon was used to delimitate manually the area of TH-ir elements in the substantia nigra ipsilateral and contralateral to the lesioned side. The area of TH-ir elements of the unlesioned side served as control (set to 100%) and was compared to the corresponding area of the lesioned side. Quantification of pallidal fiber densities was achieved after conversion the color images from the rostral and caudal GP into monochrome images, followed by a threshold setting that separated the stained fibres from the background. A rectangular frame was placed centrally in the GP to exclude striatal staining. A phase analysis was performed which measured the area of detected fibres in proportion to the total area. This ratio was calculated from both the ipsi- and contralateral side and compared subsequently with the contralateral side serving as control (set to 100 %). Parameters for threshold setting and frame size remained unchanged for analyzing both sides, but were adapted in different slices to consider different background staining and varying extension of the GP. A linear regression analysis was performed using SigmaPlot 4.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) to reveal the relationship between loss of TH-immunoreactivity in the substantia nigra and the rostral and caudal GP. Two slices per animal (n=8) and per region (substantia nigra, caudal and rostral GP) were evaluated and the mean was taken to calculate the coefficient of determination ( $r^2$ ).

In order to reveal morphological differences along the rostrocaudal axis high power magnification images (160 x 120  $\mu\text{m}$ ) of the caudal and rostral GP at different dorsoventral levels were captured as color images. A total number of 24 and 36 images were evaluated for the caudal and rostral GP, respectively. Grids of 20 x 20  $\mu\text{m}$  were overlaid digitally and the number of fibres per grid was counted. As already shown by Zaborszky and Cullinan (1996) TH-immunohistochemical analysis revealed different morphological types of DA fibers with different calibres. In the present study axons were assigned to two separate classes using morphological criteria: “thick” and “thin” axons. The reason for using morphological, instead of size criteria was that the spatial resolution was too low to allow reliable detection of the calibre of thin fibers. Thin varicose-rich and straight axons with moderate staining were classified as being “thin”. These fibers typically had a calibre of less than 0.4  $\mu\text{m}$ . Thick fibers with intense staining either smooth or with varicosities often curved and sometimes with helical segments were classified as being “thick”. Occasionally thick fibers were assorted to bundles of 3 or more fibres. The calibre of thick fibers was about 0.7-1.2  $\mu\text{m}$ . Only separable fibres in focus were included. The mean counts of thick and thin fibres and the total fiber counts per image were calculated from the pooled data for the caudal and rostral GP and compared using a t-test for independent samples.

### Microdialysis

*Stereotaxic surgery.* For stereotaxic surgery, animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) following pretreatment with atropine sulphate (0.5 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and secured in a Kopf stereotaxic apparatus (Kopf Instruments, Tujunga, USA). Six animals were implanted unilaterally with intracranial guide cannulae (CMA/12, CMA Sweden) aiming to the GP at the following coordinates (Paxinos and Watson, 1986): AP -1.4 mm, L 3.0 mm and V -5.2 mm (from dura). Each rat was given at least one week to recover from surgery.

*Microdialysis setup.* The microdialysis experiment was performed in the home cage of the animal with the lid replaced by a metal frame bearing a counterbalanced arm with the swivel assembly. Attachment to the swivel was achieved by a spring tether connected directly to the head mount via a self-made plug. A microdialysis probe (CMA/12, CMA, Solna, Sweden; exposed membrane length 2 mm) was inserted through the guide cannula and perfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (145 mM  $\text{Na}^+$ , 2.5 mM  $\text{K}^+$ , 1.2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0.9 mM  $\text{Mg}^{2+}$  and 151.7 mM  $\text{Cl}^-$ ) delivered by a CMA/100 microdialysis pump (CMA, Solna, Sweden) at



2.0  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Samples were collected every 30 min. Baseline samples were taken at least 5 hours after probe insertion to allow for stabilisation of dialysate DA and metabolite levels. All perfusion fluids contained 3  $\mu\text{M}$  nomifensine, a catecholamine reuptake inhibitor.

*Drugs.* Stock solutions of tetrodotoxin citrate (TTX, Tocris, Ellisville, USA) and nomifensine maleate (RBI, Natick, USA) at concentrations of 652  $\mu\text{M}$  and 887  $\mu\text{M}$ , respectively, were prepared in ultra pure water and stored in frozen ( $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) aliquots. For perfusion the TTX stock solution was diluted with aCSF to a final concentration of 1  $\mu\text{M}$  and nomifensine was added to all perfusion fluids in a final concentration of 3  $\mu\text{M}$ .

*Analytical Procedure.* Dialysates were analyzed for DA, DOPAC, HVA and 5-HIAA using HPLC with electrochemical detection. The mobile phase consisted of 2 g/l sodium-acetate, 5 g/l citric acid, 200-600 mg/l 1-heptanesulfonic acid (HSA), 60 mg/l  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  and 15 % (v/v) methanol with pH adjusted to 3.9 before methanol addition. Minor modifications in the concentrations of HSA and methanol were made to optimize DA peak separation if necessary. The HPLC apparatus consisted of a Flux Rheos 2000 pump (Flux Instruments, Basel, Switzerland), a cooled CMA/200 autosampler (CMA, Solna, Sweden), a Nucleosil C18 column (Bischoff, Leonberg, Germany; 5  $\mu\text{m}$  particles, length x i.d. 125 x 3 mm) and a dual electrode BAS LC4C amperometric detector (Bioanalytical Systems, Lafayette, USA) with the electrode potential set to 600 mV at high gain to quantify DA and 700 mV at a lower gain to measure the metabolites. Filter setting was 0.1 Hz and the separation was performed at room temperature. This setup allowed the quantification of DA and the metabolites in the same run. Sample run time was less than 12 min and the detection limit of DA in a standard solution was routinely about 1 pg per injection or lower.

*Verification of probe location.* After the experiments, animals were killed, the brains removed, fixed for at least 2 h in formalin and immersed in 30 % (w/v) sucrose for several days. Cryosections (60  $\mu\text{m}$ ) were taken and stained with cresyl violet. Only data from animals with correct probe location, i.e. most of the exposed dialysis membrane located within the GP, were taken for evaluation.

*Data expression and statistics.* Data are expressed as percentages of control values ( $\pm$  standard error of the mean, S.E.M.). The average concentration of the three samples before TTX perfusion was taken as control and set to 100 %. These data were analyzed by a

nonparametric one-way ANOVA for repeated measurements followed by Dunnett's multiple comparisons test where appropriate. The last baseline sample was taken as reference.

## Results

### *Effect of 6-OHDA lesions of the substantia nigra lesioning on pallidal TH-ir fibre density*

Unilateral application of 6-OHDA (15 µg in 2 µl) into the substantia nigra resulted in a severe loss of TH-ir elements in the substantia nigra (< 20 % of the TH-ir stained area of the control side) in 6 of 8 treated animals 4 weeks after lesion (Fig. 1). Two animals showed a less severe loss of TH-ir elements (20 % – 60 % of the TH-ir stained area of the control side). There is a significant correlation between the extent of substantia nigra lesion and reduction of fibre density in the rostral GP ( $r^2 > 0.93$ ) and the caudal GP ( $r^2 > 0.59$ ).

### *Rostrocaudal differences of the TH-ir fibres innervation pattern*

The density of thin fibres was significantly higher in the caudal aspects of the GP compared to the rostral GP ( $P < 0.000002$ ) whereas the opposite pattern was found for the thick fibres ( $P < 0.00002$ ) (Table 1). However, the total density of thin and thick fibers did not differ significantly between rostral and caudal levels ( $P < 0.53$ ). Most of the thin fibres were varicose-rich and straight. The thick fibres had a different morphology as they were either smooth or had varicosities and were straight or curved or even displayed helical segments. Occasionally they were assorted to bundles of 3 or more fibres which was rarely observed for the thin fibres. A representative image is shown in Fig. 2.

### *Basal dialysate levels of DA*

Basal dialysate levels of DA in the GP were close to detection limit. Therefore the catecholamine reuptake inhibitor nomifensine was included in all perfusates. The mean dialysate DA concentration in the reference baseline sample (60 µl) was  $13.6 \pm 1.6$  pg/sample (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=4$ ). Two animals had to be excluded due to low or non-detectable DA levels even under reuptake blockade.

*Pallidal DA levels after reverse microdialysis of TTX*

Perfusion of 1  $\mu$ M TTX for 60 min produced a strong decrease to about 16 % of baseline value in dialysate DA which was highly significant ( $P < 0.0008$ ; ANOVA for repeated measurements followed by Dunnett's multiple comparisons test;  $n=4$ ). After removal of TTX dialysate DA levels returned and significantly exceeded pre-drug levels starting 120 min after termination of perfusion with TTX (Fig. 3).

*Pallidal DOPAC, HVA and 5-HIAA levels after reverse microdialysis of TTX*

Perfusion with TTX also decreased DOPAC and HVA levels to about 57 % and 69 % of baseline value, respectively. The decrease was significant for DOPAC ( $P < 0.05$  ANOVA for repeated measurements followed by Dunnett's multiple comparisons test;  $n=4$ ), but not for HVA. After removal of TTX, both DOPAC and HVA exceeded pre-drug levels significantly and remained elevated during the observation period (Fig. 3).

Furthermore, TTX did not produce changes in 5-HIAA levels during application, but resulted in a significant post-application increase of dialysate 5-HIAA levels (data not shown).

*Behavior*

Reverse microdialysis of TTX produced lacrimation in all animals, salivation in 2 out of 4 animals and contralateral turning in 3 out of 4 animals.

*Probe placement*

In all animals used for microdialysis the probes were placed in the medio-caudal portion of the GP with most of the total dialysis membrane in the GP (Fig. 4). In no case dialysis membrane of probes were located in striatal tissue.

**Discussion**

Using *in vivo* microdialysis in awake rats our results demonstrate for the first time that extracellular DA release in the GP depends on neuronal activity as it is TTX-sensitive. As pallidal DA release is also calcium-dependent and responds to potassium stimulation (Hauber and Fuchs, 2000), it fulfills the most stringent criteria to prove neuronal transmitter release (for reviews see Ungerstedt, 1991; Di Chiara, 1991; Westerink, 1995). The data provide further support for the notion that DA inputs to the GP are functional and subserve a role in basal ganglia signal processing (Chesselet and Delfs, 1996).

*Effect of substantia nigra 6-OHDA lesion on pallidal TH-immunoreactivity*

The DAergic innervation of the GP is brought about by collaterals from nigrostriatal fibres arising from the substantia nigra pars compacta (Fallon and Moore, 1978; Lindvall and Björklund, 1979; Rodrigo et al., 1998). DAergic fibres bear varicosities (Zaborszky and Cullinan, 1996) and are supposed to form *en passant* synapses with pallidal cells (Arluison et al., 1984). To characterize the density and extent of the GP DA innervation in our preparation we analyzed TH immunoreactivity in rats with unilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra. As expected, unilateral destruction of nigral DAergic cell bodies with a relatively high dose of 6-OHDA produced a massive reduction of TH-ir fibres in the ipsilateral GP. The ipsilateral GP was almost devoid of fibres reacting for TH in those animals bearing a near complete lesion of substantia nigra pars compacta DA neurons. Correspondingly, a massive loss of TH-ir fibres was detected in the rat GP after intrastriatal 6-OHDA infusion (Rosenblad et al., 2000). Likewise, in monkeys systemically treated with MPTP TH-ir was reduced in the external pallidum (Jan et al., 2000), however, a relative sparing of the nigropallidal projection as compared to the nigrostriatal pathway has been observed as well (Parent et al., 1990).

It can not be ruled out that 6-OHDA infusion into the substantia nigra damaged ascending noradrenergic fibers. As TH immunoreactivity is present in both DAergic and noradrenergic fibers, reduced TH staining in the GP might be in part due to damage of noradrenergic fibers in the GP. As there is only a small number of noradrenergic fibers in the basal ganglia (Gaspar et al., 1985; Lavioie et al., 1989), TH might be a reliable marker of DAergic fibers in our preparation. Our data further indicate that there is a significant correlation between nigral and pallidal loss of TH-ir. Remarkably, the caudal GP seems to be more severely affected by a nigral lesion as compared to the rostral GP. This could be explained by a heterogenous innervation pattern. In line with the findings of Rodrigo et al. (1998) our data show that the fibre appearance varies along the rostrocaudal axis. There is evidence that nigrostriatal and nigropallidal DAergic fibers differ in their arborization pattern (see Smith and Kieval, 2000, for review). Gauthier et al. (1999) revealed that nigropallidal, but not nigrostriatal, DA fibers arborize profusely in the globus pallidus. Thus, it is very unlikely that the thick fibers in rostral GP form *en passant* synapses. These fibers are very likely thick axons that travel through the GP to reach the striatum. The thin fibers could represent a distinct nigropallidal projection. In addition, nigropallidal and nigrostriatal DAergic fibers might have different neurochemical characteristics. For instance, Parent et al. (1990) found in MPTP-treated primates that the nigropallidal projection is relatively spared compared to the nigrostriatal pathway. Our data showed that the loss of TH-ir was particularly high in the caudal GP.

Given that thin DAergic fibers predominantly innervating the caudal GP represent the nigropallidal DA projection as suggested above, these findings implicate that in rats the nigropallidal DA fibres are more sensitive to the neurotoxic effects of 6-OHDA as nigrostriatal DA fibres. However this notion is preliminary and needs further analysis.

*Microdialysis - Methodological considerations*

The spatial resolution of the microdialysis technique deserves consideration when sampling from small brain nuclei as the GP. To exclude DA spillover from the striatum we positioned the dialysis membrane into the medio-caudal aspects of the GP to ensure maximum distance to the DA rich striatum. Our immunohistochemical analysis confirmed that the pallidal target area of the dialysis membrane receives a prominent DA innervation. Though our immunohistochemical data suggest rostrocaudal differences in the pattern of the pallidal DAergic innervation we found no relationship between individual DA responses measured by microdialysis and respective probe placements.

The sampling area for DA around the dialysis probe has been suggested to be smaller than 1 mm, because this is the maximum distance radioactively labeled DA delivered from a second probe could be detected (Hoistad et al., 2000). Also, dialysate DA changes measured in core and shell subdivisions of the nucleus accumbens differed after physiological and pharmacological challenges although the lateral distance of the microdialysis probes was only 0.9 mm (Sokolowski et al., 1998) or 1.2 mm (Hedou et al., 1999). Ewing and Wightman (1984) using *in vivo* voltammetry assumed that the effective tissue diffusion distance for DA is even shorter, i.e. below 100  $\mu\text{m}$ . These data suggest that DA measured here is mainly of pallidal origin, however, most analysis on DA diffusion were made in striatal tissue which might have a diffusion dynamics different from the GP. Of course, one has to take into account that reuptake inhibition prolongs the effective diffusion distance of DA (Nicholson and Sykova, 1998). On the other hand, the reuptake inhibitor was applied *via* reverse microdialysis and supposed to act primarily around the probe as its concentration markedly decreases with increasing distance from the probe. Furthermore the density of striatal DA reuptake sites is high as compared to the GP (Mennicken et al. 1992). Therefore it is unlikely that DA sampled by pallidal microdialysis probes is merely a spillover from the striatum.

*Basal DA levels and nomifensine*

Reliable measurement of basal dialysate DA levels was achieved using nomifensine (3  $\mu\text{M}$ ) and a calcium concentration close to physiological conditions (1.2 mM) (Moghaddam and Bunney, 1989) in the perfusion fluid. The mean basal dialysate dopamine concentration was considerably lower (about 43 %) as the values of our previous study on pallidal DA (Hauber and Fuchs, 2000). This reduction might be primarily due to a decreased nomifensine concentration (from 30  $\mu\text{M}$  to 3  $\mu\text{M}$ ). Corresponding nomifensine-related changes in DA basal levels were found in the striatum, as a decrease from 10  $\mu\text{M}$  to 1  $\mu\text{M}$  nomifensine resulted in 2-3 fold reduction in dialysate DA levels (Nomikos et al., 1990). Together these data suggest a comparable efficacy of pallidal and striatal DA reuptake although quantitative autoradiographic analysis revealed a much lower density of DA uptake sites in the GP as compared to the striatum (Mennicken et al., 1992).

*Effects of TTX on pallidal DA levels*

A major finding of the present study is that extracellular DA in the rat GP is TTX-sensitive implicating that the release is a result of neuronal activity. There is consistent evidence that chronic nomifensine application *via* reverse microdialysis does not alter major pharmacological and physiological characteristics of extracellular DA release (Di Chiara, 1990; Feenstra and Botterblom, 1996). Hence, TTX sensitivity and calcium-dependency of prefrontal DA release can be demonstrated under conditions of reuptake inhibition with a comparable nomifensine concentration (5  $\mu\text{M}$ ) (Santiago et al., 1993b). However, chronic reuptake blockade might elevate extracellular DA levels resulting in an unphysiologically high DA tone, e.g. on DA D<sub>2</sub> autoreceptors. Therefore it is conceivable that the magnitude of changes in extracellular DA after pharmacological challenge is difficult to compare quantitatively to conditions without reuptake inhibition. The levels of DA and metabolites significantly increased about 120 min after cessation of TTX administration. Likewise, rebound DA release was observed after perfusion with cocaine (Lee et al., 2001) which acts on DA neurons in part through inhibition of Na<sup>+</sup> channels (Kiyatkin and Rebec, 2000). However, the mechanisms underlying rebound DA release as observed here are unknown, as long-term effects of TTX have been rarely investigated. Taken together, our finding that dialysate DA levels are highly responsive for TTX even during partial reuptake inhibition suggests that extracellular DA levels in the GP depend on neuronal activity. Otherwise, TTX would not be effective in blocking pallidal DA efflux transiently. In our earlier study we demonstrated that GP extracellular DA is also calcium-dependent and responds to potassium

stimulation (Hauber and Fuchs, 2000). Therefore pallidal DA fulfills the most stringent criteria to prove neuronal transmitter release (for reviews see Ungerstedt, 1991; Di Chiara, 1991; Westerink, 1995) and our data add further support to the view that DAergic inputs to the GP are functional.

#### *Effects of TTX on pallidal metabolite levels*

Changes in dialysate levels of the major extracellular DA metabolites DOPAC and HVA also respond to TTX perfusion with a delay of at least one sample (30 min). Initially TTX induced a decrease in DOPAC levels as already shown by Westerink et al. (1987) followed by a long lasting increase. The biochemical mechanisms underlying changes of DA metabolites are difficult to delineate. DOPAC is a product of extracellular DA degradation by monoamine oxidase, an enzyme known to be present in the GP (Saura et al., 1992). The diminished DOPAC levels might be simply due to the reduced DA release after TTX and thus to a reduced substrate availability. However, this explanation is complicated by the fact that extracellular DOPAC is assumed to be mainly a marker of DA synthesis originating from a cytoplasmatic pool of newly synthesized DA not being recently released (Soares-da-Silva and Garrett, 1990; Zetterstrom et al., 1988). Therefore, an alternative explanation is that decreased DA release after TTX could lead to an intracellular accumulation of DA in the vesicular and cytoplasmatic pool (Arbuthnott et al., 1990). In turn, DA synthesis would be down-regulated thereby decreasing DOPAC formation through fast inhibitory feedback mechanisms.

The time course of HVA and DOPAC levels after TTX perfusion were very similar in our experiment. This might reflect the fact that most extracellular DOPAC is rapidly cleared by the catechol-O-methyltransferase to HVA (Cumming et al., 1992).

Taken together, the fact that changes of DA, DOPAC and HVA were time-locked after TTX perfusion add support to the notion the pallidal DA innervation is functional as DA metabolizing systems are operative in a way shown for other nuclei receiving DAergic input (Santiago et al., 1993a; Westerink et al., 1987).

#### *Implications for the role of pallidal DA in the basal ganglia*

Immunocytochemical findings revealed that TH-positive fibers were in close proximity to cholinergic neurons in ventromedial aspects of the GP suggesting that DAergic afferents might influence forebrain cholinergic neurons (Zaborsky and Cullinan, 1996, Rodrigo et al., 1998, Zaborsky and Duque, 2000). In line with this notion the basal forebrain was found to play a complex role in amphetamine-stimulated cortical acetylcholine release (Arnold et al.,

2001). Thus DA in the GP measured here might act on forebrain cholinergic neurons which are involved in control of cognitive aspects of behaviour (Sarter and Bruno 1994). Furthermore, DA in the GP modulates GABAergic projection neurons which are part of the indirect basal ganglia pathway (Chesselet and Delfs, 1996). There is evidence that DA by acting on D<sub>2</sub> receptors in the GP control gene expression in pallidal neurons (Marshall et al., 2001) as well as depolarization-induced pallidal GABA release (Floran et al., 1997) and intra-GP administration of DA or DA ligands changed activity in some pallidal neurons (Napier et al., 1991; Querejeta et al., 2001). In addition, pallidal DA subserves motor functions as blockade of intra-GP DA receptors resulted in akinesia in rats (Hauber and Lutz, 1999b). Further evidence for a major role of pallidal DA in control of motor behaviour has been provided in studies showing that intra-GP DA infusions were able to partially restore motor deficits in rats with unilateral lesion of the medial forebrain bundle (Galvan et al., 2001). Likewise, glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) induced sprouting of DAergic axons in the GP and substantia nigra of parkinsonian primates have been correlated with functional recovery from motor symptoms (Gash et al., 1996). Furthermore, the massive reduction of TH-ir fibres (Jan et al., 2000) and of tissue DA levels (Hornykiewicz, 1998; Ploska et al., 1982) in the external pallidum in parkinsonian patients most likely contributes to hypokinesia in this disease (Hornykiewicz, 1998). In line with these latter studies the present data confirm that lesions of substantia nigra DA neurons produced a massive impairment of the DAergic input in the rat GP. Our finding that pallidal DA release is of neuronal origin provides further support to the view that DAergic inputs to the GP are functional and play a significant role in basal ganglia motor control (Chesselet and Delfs, 1996).

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ha2340/4-1). The authors would like to thank S. Nitschke and A. Votteler for expert technical assistance and Dres B. Kretschmer and V. Pedersen for advice in microdialysis and immunohistochemistry, respectively. The TTX data have been published in abstract form on the international conference on „Monitoring Molecules in Neuroscienc“ held in June 2001 in Dublin, Ireland.



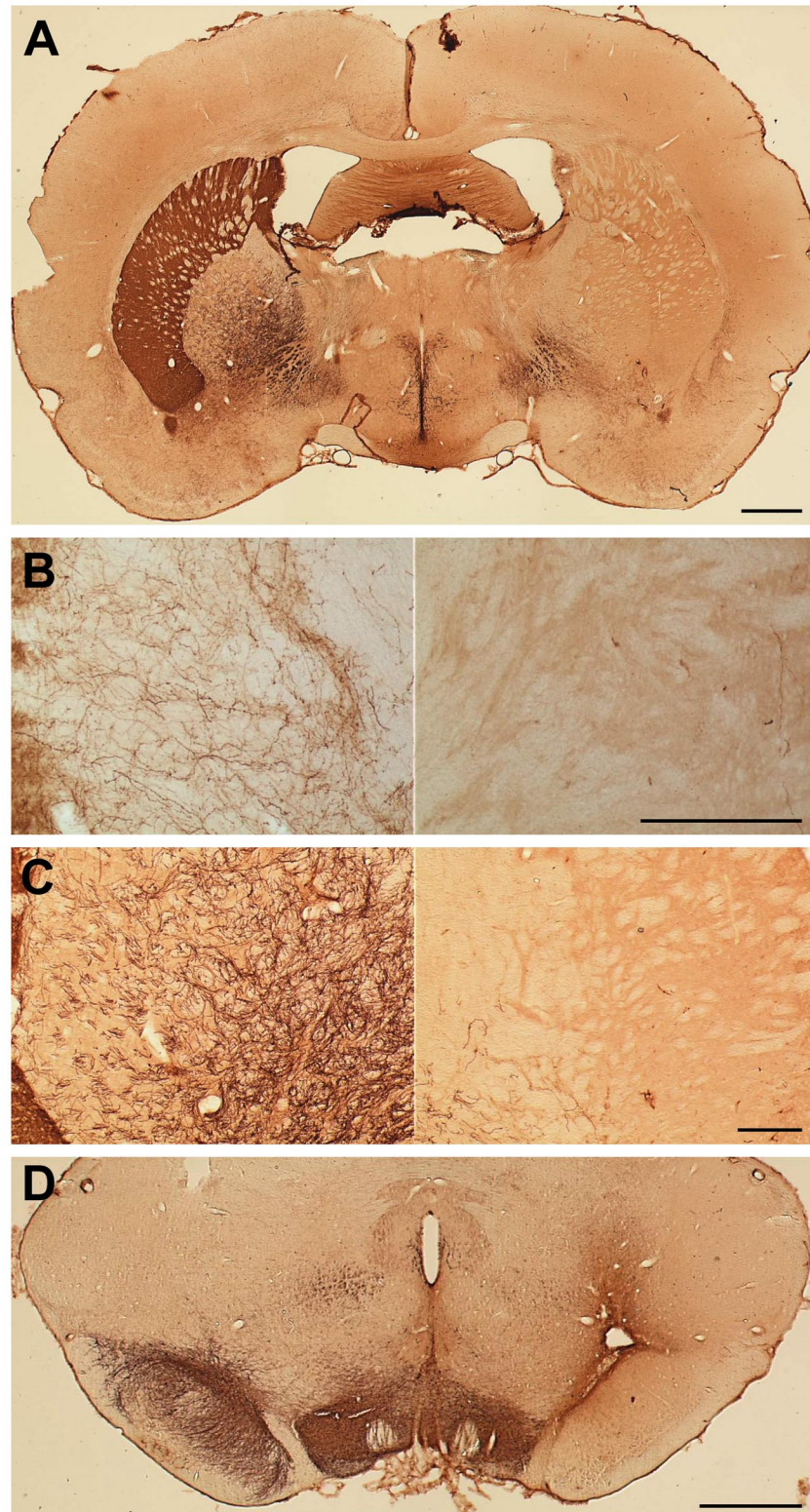
## References

- Arbuthnott, G. W., Fairbrother, I. S., and Butcher, S. P., 1990. Dopamine release and metabolism in the rat striatum: an analysis by 'in vivo' brain microdialysis. *Pharmacol Ther.* 48, 281-293.
- Arluison, M., Dietl, M., and Thibault, J., 1984. Ultrastructural morphology of dopaminergic nerve terminals and synapses in the striatum of the rat using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry: a topographical study. *Brain Res Bull.* 13, 269-285.
- Camps, M., Kelly, P. H., and Palacios, J. M., 1990. Autoradiographic localization of dopamine D 1 and D 2 receptors in the brain of several mammalian species. *J Neural Transm Gen Sect.* 80, 105-127.
- Chesselet, M. F., and Delfs, J. M., 1996. Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci.* 19, 417-422.
- Cossette, M., Levesque, M., and Parent, A., 1999. Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neurosci Res.* 34, 51-54.
- Cumming, P., Brown, E., Damsma, G., and Fibiger, H., 1992. Formation and clearance of interstitial metabolites of dopamine and serotonin in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem.* 59, 1905-1914.
- Di Chiara, G., 1990. In-vivo brain dialysis of neurotransmitters. *Trends Pharmacol Sci.* 11, 116-121.
- Di Chiara, G. 1991. Brain dialysis of monoamines. In: Robinson, T. E. and Justice, J. B. J. (Eds.), *Microdialysis in the neurosciences.* Elsevier Press, Amsterdam London New York Tokyo, pp 175-187.
- Ewing, A. G., and Wightman, R. M., 1984. Monitoring the stimulated release of dopamine with in vivo voltammetry. II: Clearance of released dopamine from extracellular fluid. *J Neurochem.* 43, 570-577.
- Fallon, J. H., and Moore, R. Y., 1978. Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol.* 180, 545-580.
- Feenstra, M. G., and Botterblom, M. H., 1996. Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty. *Brain Res.* 742, 17-24.
- Feger, J., 1997. Updating the functional model of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 20, 152-153.
- Floran, B., Aceves, J., Sierra, A., and Martinez-Fong, D., 1990. Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett.* 116, 136-140.
- Floran, B., Floran, L., Sierra, A., and Aceves, J., 1997. D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett.* 237, 1-4.
- Galvan, A., Floran, B., Erlij, D., and Aceves, J., 2001. Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J Neural Transm.* 108, 153-166.
- Gash, D. M., Zhang, Z., Ovadia, A., Cass, W. A., Yi, A., Simmerman, L., Russell, D., Martin, D., Lapchak, P. A., Collins, F., Hoffer, B. J., and Gerhardt, G. A., 1996. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature.* 380, 252-255.
- Gauthier, J., Parent, M., and Parent, A., 1999. The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res.* 834, 228-232.
- Hauber, W., and Fuchs, H., 2000. Dopamine release in the rat globus pallidus characterised by in vivo microdialysis. *Behav Brain Res.* 111, 39-44.

- Hauber, W., and Lutz, S., 1999a. Blockade of dopamine D2, but not of D1 receptors in the rat globus pallidus induced Fos-like immunoreactivity in the caudate-putamen, substantia nigra and entopeduncular nucleus. *Neurosci Lett.* 271, 73-76.
- Hauber, W., and Lutz, S., 1999b. Dopamine D1 or D2 receptor blockade in the globus pallidus produces akinesia in the rat. *Behav Brain Res.* 106, 143-150.
- Hedou, G., Feldon, J., and Heidbreder, C. A., 1999. Effects of cocaine on dopamine in subregions of the rat prefrontal cortex and their efferents to subterritories of the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol.* 372, 143-155.
- Hoistad, M., Kehr, J., Andbjør, B., Jansson, A., and Fuxe, K., 2000. Intracerebral infusion of H-dopamine and H-mannitol in the striatum of halothane-anaesthetized male rats. A dual-probe microdialysis study of long-distance diffusion. *Eur J Neurosci.* 12, 2505-2514.
- Hornykiewicz, O., 1998. Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology.* 51, S2-9.
- Jan, C., François, C., Tandé, D., Yelnik, J., Tremblay, L., Agid, Y., and Hirsch, E., 2000. Dopaminergic innervation of the pallidum in the normal state, in MPTP-treated monkeys and in parkinsonian patients. *Eur J Neurosci.* 12, 4525-4535.
- Kelland, M. D., Soltis, R. P., Anderson, L. A., Bergstrom, D. A., and Walters, J. R., 1995. In vivo characterization of two cell types in the rat globus pallidus which have opposite responses to dopamine receptor stimulation: comparison of electrophysiological properties and responses to apomorphine, dizocilpine, and ketamine anesthesia. *Synapse.* 20, 338-350.
- Lindvall, O., and Björklund, A., 1979. Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Res.* 172, 169-173.
- Mansour, A., Meador-Woodruff, J. H., Bunzow, J. R., Civelli, O., Akil, H., and Watson, S. J., 1990. Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization- receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci.* 10, 2587-2600.
- Marshall, J. F., Henry, B. L., Billings, L. M., and Hoover, B. R., 2001. The role of the globus pallidus D2 subfamily of dopamine receptors in pallidal immediate early gene expression. *Neuroscience.* 105, 365-378.
- Mennicken, F., Savasta, M., Peretti-Renucci, R., and Feuerstein, C., 1992. Autoradiographic localization of dopamine uptake sites in the rat brain with 3H-GBR 12935. *J Neural Transm Gen Sect.* 87, 1-14.
- Miller, G. W., Gainetdinov, R. R., Levey, A. I., and Caron, M. G., 1999. Dopamine transporters and neuronal injury. *Trends Pharmacol Sci.* 20, 424-429.
- Moghaddam, B., and Bunney, B. S., 1989. Ionic composition of microdialysis perfusing solution alters the pharmacological responsiveness and basal outflow of striatal dopamine. *J Neurochem.* 53, 652-654.
- Moriizumi, T., and Hattori, T., 1992. Separate neuronal populations of the rat globus pallidus projecting to the subthalamic nucleus, auditory cortex and pedunculopontine tegmental area. *Neuroscience.* 46, 701-710.
- Napier, T. C., Simson, P. E., and Givens, B. S., 1991. Dopamine electrophysiology of ventral pallidal/substantia innominata neurons: comparison with the dorsal globus pallidus. *J Pharmacol Exp Ther.* 258, 249-262.
- Nicholson, C., and Sykova, E., 1998. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.* 21, 207-215.
- Nomikos, G. G., Damsma, G., Wenkstern, D., and Fibiger, H. C., 1990. In vivo characterization of locally applied dopamine uptake inhibitors by striatal microdialysis. *Synapse.* 6, 106-112.
- Parent, A., and Hazrati, L.-N., 1995a. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev.* 20, 91-127.

- Parent, A., and Hazrati, L. N., 1995b. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev.* 20, 128-154.
- Parent, A., Lavoie, B., Smith, Y., and Bedard, P., 1990. The dopaminergic nigropallidal projection in primates: distinct cellular origin and relative sparing in MPTP-treated monkeys. *Adv Neurol.* 53, 111-116.
- Paxinos, G., and Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, San Diego, New York.
- Ploska, A., Taquet, H., Javoy-Agid, F., Gaspar, P., Cesselin, F., Berger, B., Hamon, M., Legrand, J. C., and Agid, Y., 1982. Dopamine and methionine-enkephalin in human brain. *Neurosci Lett.* 33, 191-196.
- Querejeta, E., Delgado, A., Valdiosera, R., Erlij, D., and Aceves, J., 2001. Intrapallidal D(2) dopamine receptors control globus pallidus neuron activity in the rat. *Neurosci Lett.* 300, 79-82.
- Richfield, E. K., Young, A. B., and Penney, J. B., 1987. Comparative distribution of dopamine D-1 and D-2 receptors in the basal ganglia of turtles, pigeons, rats, cats, and monkeys. *J Comp Neurol.* 262, 446-463.
- Rodrigo, J., Fernandez, P., Bentura, M. L., de Velasco, J. M., Serrano, J., Uttenthal, O., and Martinez-Murillo, R., 1998. Distribution of catecholaminergic afferent fibres in the rat globus pallidus and their relations with cholinergic neurons. *J Chem Neuroanat.* 15, 1-20.
- Rosenblad, C., Kirik, D., and Björklund, A., 2000. Sequential administration of GDNF into the substantia nigra and striatum promotes dopamine neuron survival and axonal sprouting but not striatal reinnervation or functional recovery in the partial 6-OHDA lesion model. *Exp Neurol.* 161, 503-516.
- Ruskin, D. N., Bergstrom, D. A., Baek, D., Freeman, L. E., and Walters, J. R., 2001. Cocaine or selective block of dopamine transporters influences multisecond oscillations in firing rate in the globus pallidus. *Neuropsychopharmacology.* 25, 28-40.
- Ruskin, D. N., Bergstrom, D. A., Kaneoke, Y., Patel, B. N., Twery, M. J., and Walters, J. R., 1999. Multisecond oscillations in firing rate in the basal ganglia: robust modulation by dopamine receptor activation and anesthesia. *J Neurophysiol.* 81, 2046-2055.
- Santiago, M., Machado, A., and Cano, J., 1993a. Regulation of prefrontal cortical dopamine release by dopamine receptor agonists and antagonists. *Eur J Pharmacol.* 239, 83-91.
- Santiago, M., Machado, A., and Cano, J., 1993b. Regulation of the prefrontal cortical dopamine release by GABAA and GABAB receptor agonists and antagonists. *Brain Res.* 630, 28-31.
- Sato, F., Lavalley, P., Levesque, M., and Parent, A., 2000. Single-axon tracing study of neurons of the external segment of the globus pallidus in primate. *J Comp Neurol.* 417, 17-31.
- Saura, J., Kettler, R., Da Prada, M., and Richards, J. G., 1992. Quantitative enzyme radioautography with 3H-Ro 41-1049 and 3H-Ro 19-6327 in vitro: localization and abundance of MAO-A and MAO-B in rat CNS, peripheral organs, and human brain. *J Neurosci.* 12, 1977-1999.
- Smith, Y., and Kieval, J. Z., 2000. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 23, S28-33.
- Soares-da-Silva, P., and Garrett, M. C., 1990. A kinetic study of the rate of formation of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) in the brain of the rat: implications for the origin of DOPAC. *Neuropharmacology.* 29, 869-874.
- Sokolowski, J. D., Conlan, A. N., and Salamone, J. D., 1998. A microdialysis study of nucleus accumbens core and shell dopamine during operant responding in the rat. *Neuroscience.* 86, 1001-1009.

- Ungerstedt, U. 1991. Introduction to intracerebral microdialysis. In: Robinson, T. E. and Justice, J. B. J. (Eds.), *Microdialysis in the neurosciences*. Elsevier Press, Amsterdam London New York Tokyo, pp 3-22.
- Westerink, B. H., 1995. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav Brain Res.* 70, 103-124.
- Westerink, B. H., Tuntler, J., Damsma, G., Rollema, H., and de Vries, J. B., 1987. The use of tetrodotoxin for the characterization of drug-enhanced dopamine release in conscious rats studied by brain dialysis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 336, 502-507.
- Yung, K. K., Bolam, J. P., Smith, A. D., Hersch, S. M., Ciliax, B. J., and Levey, A. I., 1995. Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience.* 65, 709-730.
- Zaborszky, L., and Cullinan, W. E., 1996. Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. I. Dopamine-beta-hydroxylase- and tyrosine hydroxylase input to cholinergic neurons. *J Comp Neurol.* 374, 535-554.
- Zetterstrom, T., Sharp, T., Collin, A. K., and Ungerstedt, U., 1988. In vivo measurement of extracellular dopamine and DOPAC in rat striatum after various dopamine-releasing drugs; implications for the origin of extracellular DOPAC. *Eur J Pharmacol.* 148, 327-334.



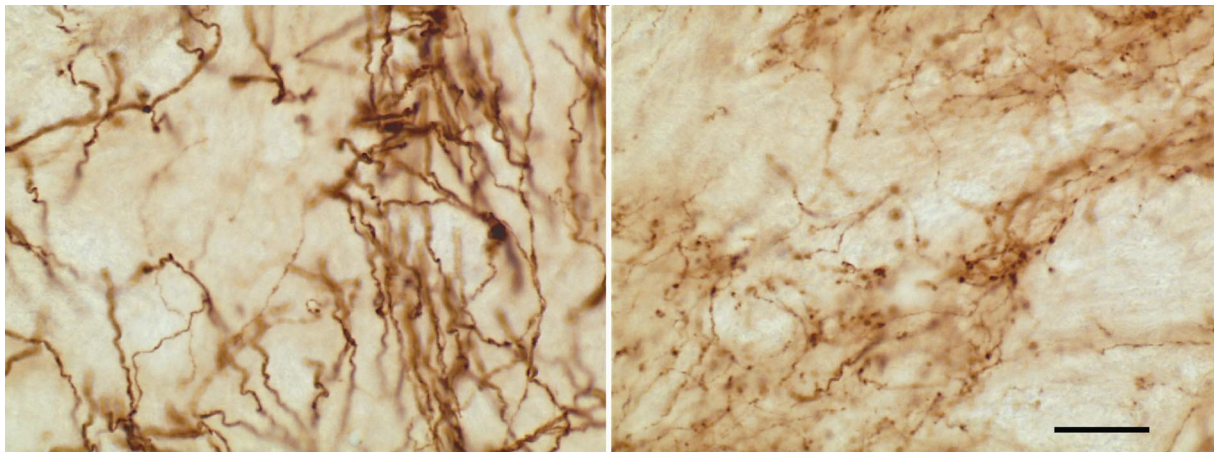
**Fig. 1:** Effect of unilateral nigral 6-OHDA infusion on TH-immunoreactivity in the substantia nigra (D), rostral GP (C) and caudal GP (B). A brain section at the rostral level of the GP is displayed at low power magnification in (A). Scale bars represent 1 mm (A and D) or 250  $\mu$ m (B and C). The lesioned side is shown on the right side.



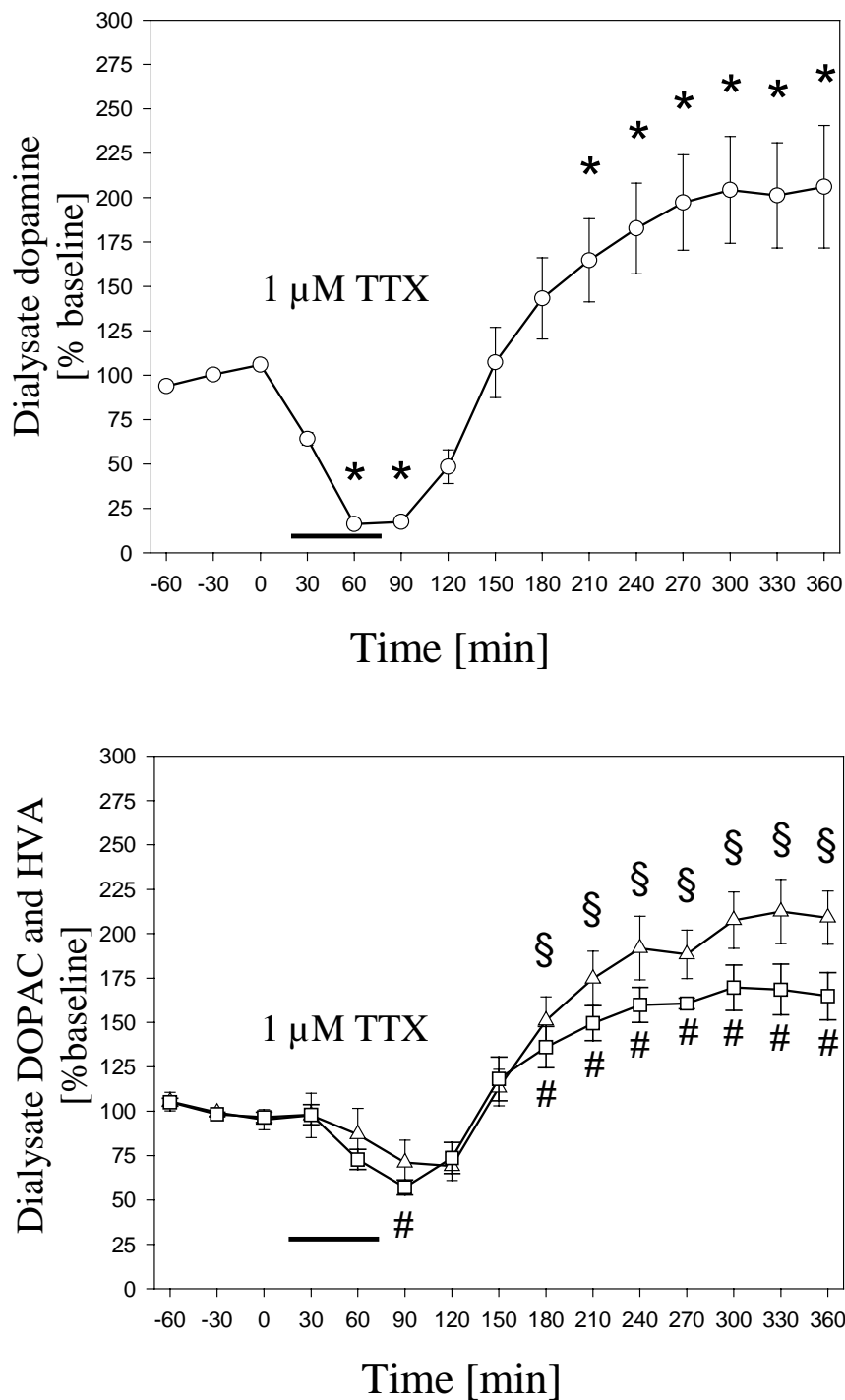
**Table 1:** Comparison of the innervation pattern with regard to the fibre calibre between caudal and rostral GP.

	caudal	rostral
thin	27,5 ± 3,5	11,8 ± 0,8 *
thick	16,4 ± 2,1	36,3 ± 3,1 *
total	44,0 ± 3,8	48,0 ± 3,1 n.s.

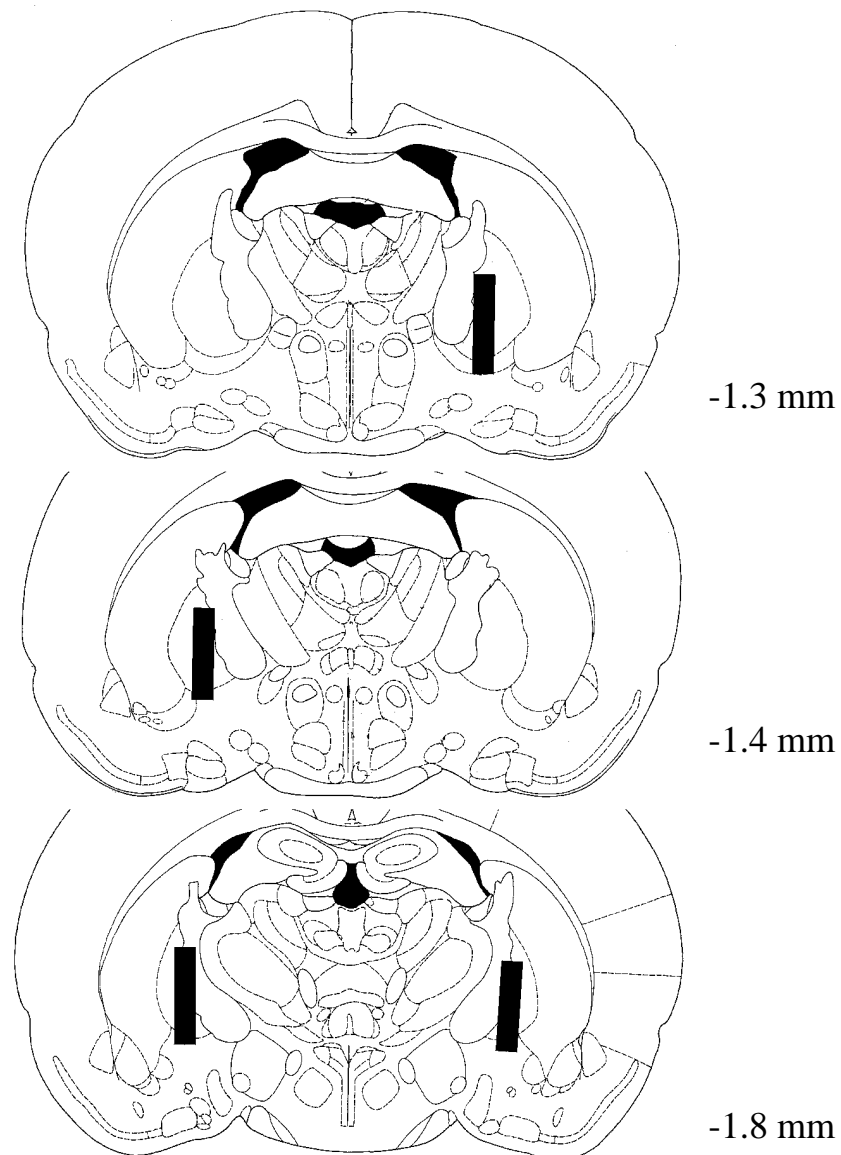
Mean fibre counts per image ± S.E.M. . The counts for thin and thick fibres and the total counts (thin + thick) for the rostral GP were compared with the caudal GP using a t-test for independent samples, \* P<0.0001 vs caudal, n.s. not significant.



**Fig. 2:** Innervation pattern of the rostral (left) and caudal (right) GP as visualized with TH-immunohistochemistry. In the caudal GP the number of thin fibers was significantly higher compared to the number of thick fibers. The opposite pattern was found within the rostral GP. The scale bar represents 25 µm.



**Fig. 3:** Effect of perfusion with 1  $\mu$ M TTX on dialysate DA (upper panel) and main metabolites DOPAC (squares) and HVA (triangles) (lower panel) in the GP. The black bar indicates time of drug delivery.  $P < 0.05$  as compared to control value ( $T = 0$  min) for DA (\*), DOPAC (#) and HVA (§); ANOVA for repeated measurements followed by Dunnett's multiple comparisons test.



**Fig. 4:** Schematic drawing of the probe locations according to the atlas of (Paxinos and Watson, 1986). The black lines represent the position of the dialysis membrane in a representative plane (from top to bottom: 1.3 mm, 1.4 mm and 1.8 mm posterior to bregma ).



*Effects of Physiological and Pharmacological Stimuli*  
*on Dopamine Release in the Rat Globus Pallidus*

Holger Fuchs, Jens Nagel and Wolfgang Hauber

Abteilung Tierphysiologie, Biologisches Institut  
Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57  
D-70550 Stuttgart, Germany

Running title: Dopamine Release in the Rat Globus pallidus

Acknowledgements

Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ha 2340/4-2). This publication is part of the PhD thesis of H.F.

key words: d-amphetamine, cocaine, handling, feeding, microdialysis, extrastriatal dopamine.

Correspondence to: Dr. W. Hauber; Abt. Tierphysiologie, Biologisches Institut, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70550 Stuttgart; Germany; Phone: +49-711-685-5003, Fax: +49-711-685-5090; E-Mail: Hauber@po.uni-stuttgart.de

## **Abstract**

A major aspect of understanding functions of the globus pallidus (GP) in the basal ganglia is the significance of its dopaminergic innervation. The present microdialysis study was designed to characterize the pallidal release of dopamine (DA) and metabolites in response to various physiological and pharmacological stimuli known to stimulate DA efflux in the nucleus accumbens (NAcc). Results show that a mild aversive stimulus (handling) and a rewarding stimulus (feeding with unfamiliar, palatable food, Fonzie<sup>®</sup>) both produced a significant increase of dialysate DA and its major metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) in the GP. Likewise, reverse microdialysis of d-amphetamine or cocaine in increasing concentrations of 0.1 to 100  $\mu$ M produced a dose-dependent increase in dialysate DA in the GP. The magnitude of pallidal DA release was very similar to that observed in a complementary microdialysis experiment in the NAcc using the same cumulative dosing regimen of d-amphetamine and cocaine. Taken together, the present data demonstrate that DA transmission in extrastriatal basal ganglia nuclei as the GP is highly responsive to physiological and pharmacological stimuli which stimulate DA efflux in the NAcc. These findings add further support to the notion that sensorimotor structures of the basal ganglia as the GP might be involved in neural reward processing and point to the possibility that rewarding effects of psychostimulants involve actions on DA in the GP.

## Introduction

The globus pallidus (GP), the rodent homologue of the primate external part of the globus pallidus (GPe), is an integral component of the indirect pathway of the basal ganglia connecting the caudate-putamen (CPu) with the substantia nigra pars reticulata and the nucleus entopeduncularis (Parent and Hazrati, 1995). Recent evidence suggests that the GP is not solely a relay station but rather is in a strategic position to control basal ganglia information flow (Chesselet and Delfs, 1996). An important aspect of understanding pallidal functions in the basal ganglia which has been largely neglected is the significance of its dopaminergic innervation. The DAergic innervation of the GP arises from substantia nigra pars compacta neurons (Fallon and Moore, 1978; Lindvall and Björklund, 1979; Cossette et al., 1999). There exist at least two morphologically different subtypes of nigrostriatal axons, one that arborizes profusely in the striatum and poorly in extrastriatal nuclei as the GP and another that behaves conversely (Gauthier et al., 1999). Recent neuroanatomical studies further showed that nigrostriatal and nigropallidal projections arising from distinct neuronal populations can be separated in primates (Smith, 1989; Smith and Kieval, 2000).

There is increasing evidence that the DAergic innervation of the GP is functional. For instance, the GP displays tyrosine hydroxylase immunoreactive fibres and varicosities (Arluison et al., 1984; Zaborszky and Cullinan, 1996) and expresses DA D1, D2, D3, D4 and D5 receptors (Richfield et al., 1987; Mansour et al., 1990; Larson and Ariano, 1995; Mrzljak et al., 1996; Ciliax et al., 2000). Furthermore, DA reuptake transporters (Mennicken et al., 1992) and monoaminoxidase activity (Saura et al., 1992) have been demonstrated in the GP. Electrophysiological studies revealed that pallidal neurons responded to systemic application of DAergic drugs by changes in firing rate and pattern (Kelland et al., 1995; Ruskin et al., 1998, 1999). Using *in vivo* microdialysis, we showed that DA in the GP is of neuronal origin, released impulse-dependently and is responsive to salient stimuli, e.g. food (Hauber and Fuchs, 2000; H. Fuchs and W. Hauber, unpublished observations).

The present study was designed to characterize GP DA release in response to various physiological and pharmacological stimuli. We examined the effects of an appetitive, unfamiliar stimulus (palatable food) and an aversive stimulus (handling). Numerous studies showed that these stimuli activate the mesocortical and mesolimbic DA projections and evoke a significant DA release in the NAcc or the PFC (e.g. Bassareo and Di Chiara, 1997, 1999; Di Chiara, 1998; Feenstra et al., 1998). Furthermore, we investigated the effects of pharmacological stimulation of GP DA using the psychostimulants cocaine and

d-amphetamine. It is well documented that both drugs stimulate DA efflux in the NAcc (e.g. Carboni et al., 1989; Pierce and Kalivas, 1997; Hedou et al., 1999). We tested their effects after reverse microdialysis in the GP using a cumulative dosing procedure with a dose range between 0.1-100  $\mu$ M. In order to perform quantitative comparisons we also investigated the effects of both drugs by reverse dialysis in the NAcc using the same cumulative dosing regimen.

## Materials and Methods

*Subjects.* Male CD rats (Charles River, Sulzfeld, Germany) were used for all experiments and housed in groups up to five animals in transparent macrolon cages (type IV; 35 x 55 x 10 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) in a 12:12-h light-dark cycle before surgery. Temperature ( $20\pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $50\pm 10\%$ ) were kept constant in the animal house. Rats were given ad libitum access to water and food (standard maintenance chow, Altromin, Lage, Germany).

*Stereotaxic surgery.* For stereotaxic surgery, animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) following pretreatment with atropine sulphate (0.5 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and secured in a Kopf stereotaxic apparatus (Kopf Instruments, Tujunga, USA). Ten animals, weighing 220-270 g were implanted unilaterally with intracranial guide cannulae (CMA/12, CMA, Solna, Sweden) aiming to the GP at the following coordinates (Paxinos and Watson, 1986): AP -1.1 mm L 2.5 mm and V -4.5 mm (from dura). Ten animals, weighing 200-260 g, were implanted unilaterally with intracranial guide cannulae (CMA/12, CMA, Solna, Sweden) aiming to the NAcc at the following coordinates (Paxinos and Watson, 1986): AP +2.0 mm L -1.2 mm and V -6.0 mm (from skull at bregma). After surgery rats were housed individually in macrolon cages (type III; 37 x 21 x 30 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) with raised solid-walled lids. Each rat was given at least one week to recover from surgery.

*Microdialysis setup.* Microdialysis was performed in the home cage of the animal with the lid replaced by a metal frame bearing a counter-balanced arm with the swivel assembly. Dual channel liquid swivels, either Tsumura TCS2-23 (Pronexus, Skärholmen, Sweden) (for NAcc microdialysis) or Instech low torque swivels (375/D22/QM, Instech Labs., Plymouth Meeting, USA) (for GP microdialysis) were used. Attachment to the swivel was achieved by a spring tether connected directly to the head mount via a self-made plug. A microdialysis probe

(CMA/12, CMA, Solna, Sweden; exposed membrane length 2 mm) was inserted through the guide cannula 12-14 h before the first baseline sample and perfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (147 mM Na<sup>+</sup>, 3 mM K<sup>+</sup>, 1.2 mM Ca<sup>2+</sup>, and 1 mM Mg<sup>2+</sup>) overnight using a CMA/100 microdialysis pump (CMA, Solna, Sweden) at 2.0 µl/min. Samples were collected every 20 min.

*Drugs.* Stock solutions of d-amphetamine sulfate (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and cocaine hydrochloride (Merck, Darmstadt, Germany) at concentrations of 10 mM were prepared in aCSF and stored in frozen (-70 °C) aliquots.

*Microdialysis experiments with physiological stimuli.* At the beginning of the experiments food pellets were removed from the home cage, water was still available. Subsequently, sampling of dialysates from the GP was started and 5 samples were taken until a rat was exposed to a physiological stimulus. Two different stimuli were tested: I) Handling, i.e. a rat was picked up, handled gently for 20 min (i.e. for one sample) within a towel and put back in the home cage (Feenstra et al., 1995). If mild restriction did not prevent the rat from jumping back into the home cage, it was picked immediately again. II) Unfamiliar, highly palatable food consisting of 3-4 pieces (approx. 3 g) of Fonzies<sup>®</sup> (snack food, kindly provided by UB Snack Food, Donauwoerth, Germany) (Bassareo and Di Chiara, 1999). Fonzies were given for 20 min in the home cage and removed afterwards. The amount of Fonzies eaten was estimated by calculating the food weight difference. Each animal was exposed to one physiological stimulus.

*Microdialysis experiments with pharmacological stimuli.* Three hours after handling or Fonzies feeding, d-amphetamine or cocaine were applied via reverse microdialysis into the GP or NAcc in a cumulative manner. Increasing concentrations (0.1, 1, 10 and 100 µM) of each compound were added to the perfusion fluid for 60 min each, followed by one hour with perfusion fluid alone. Each animal received either d-amphetamine or cocaine. Some animals exposed to physiological stimuli were not subsequently tested for effects of pharmacological stimuli.

*Analytical Procedure.* Dialysates were analyzed for DA, DOPAC and HVA using HPLC with electrochemical detection. The mobile phase consisted of 2 g/l sodium-acetate, 5 g/l citric acid, 2 g/l 1-heptanesulfonic acid, 110 mg/l Na<sub>2</sub>-EDTA and 18,5 % (v/v) methanol with pH at

3.9 before methanol addition. Minor modifications in the concentrations of HSA and methanol were made to optimize DA peak separation if necessary. The HPLC apparatus consisted of a Flux Rheos 2000 pump (Flux Instruments, Basel, Switzerland), a refrigerated CMA/200 autosampler (CMA, Solna, Sweden), a Nucleosil C<sub>18</sub> column (Bischoff, Leonberg, Germany; 5 µm particles, length x i.d. 125 x 3 mm) and a dual electrode BAS LC4C amperometric detector (Bioanalytical Systems, Lafayette, USA) with the electrode potential set to 600 mV at high gain to quantify DA and 700 mV at a lower gain to measure the metabolites. Filter setting was 0.1 Hz and the separation was performed at room temperature. This set-up allowed the quantification of DA and the metabolites in the same run, where DA elutes after the metabolites. Sample run time was less than 7 min and the detection limit of DA in a standard solution was routinely about 2 pg per injection or lower.

*Reconstruction of probe location.* After the experiments, animals were killed by an overdose of pentobarbital, brains were removed, fixed for at least 2 h in formalin and immersed in 30 % (w/v) sucrose for several days. Cryosections (60 µm) were taken and stained with cresyl violet. Only data from animals with correct probe location, i.e. with most of the exposed dialysis membrane located within the GP or NAcc were evaluated. The location of microdialysis probes aimed at the GP and the NAcc are shown in Fig. 1. Most of the accumbal probes were located predominately in the shell subdivision of the NAcc. The pallidal probes were placed at the medial GP with maximum distance to CPU.

*Data expression and statistics.* Data are expressed as percentages of control values ( $\pm$  standard error of the mean, SEM). The mean DA and metabolite dialysate concentration of the three samples before presentation of physiological stimuli or pharmacological stimuli was taken as control and set to 100 %. These data were analyzed by a nonparametric one-way ANOVA for repeated measurements followed by Dunnett's multiple comparisons test with the last baseline sample as reference where appropriate. In addition, a one-way ANOVA with treatment or target area as independent factors and time as repeated measure were performed to compare stimulus induced DA release in GP and NAcc or effects of d-amphetamine and cocaine. Results with significant overall effects were subjected to a contrast analysis to compare isolated time points for significant differences. Values of  $p < 0.05$  were considered as statistically significant. All statistical evaluations were made with Statistica 5.5 (StatSoft, Tulsa, USA).

## Results

### *Basal DA levels in the GP and NAcc.*

Baseline values in 4 out of 10 animals with pallidal probes were close to or below of the detection limit and excluded from evaluation. The mean dialysate DA concentration ( $\pm$ SEM) of all baseline samples from the GP prior to presentation of pharmacological and physiological stimuli was  $3.24 \pm 0.13$  pg/20  $\mu$ l, the mean dialysate concentration of all samples from the NAcc prior to presentation of pharmacological stimuli was  $2.23 \pm 0.33$  pg/20  $\mu$ l, respectively. Means were significantly different (t-test for independent groups,  $t=3.19$ ,  $p=0.0021$ ). Two representative chromatograms from GP dialysates before and during handling are given in Fig. 2. A small number of chromatograms (11 out of 836) could not be evaluated reliably and were considered as missing values. Respective chromatograms refer to samples at least one hour after presentation of physiological stimuli.

### *Effects of Fonzie's feeding on DA and metabolites in the GP.*

Most of the rats were inactive or sleeping before Fonzie's feeding. Presentation of Fonzie's elicited sniffing in all animals ( $N=5$ ). Three of 5 animals started to eat Fonzie's within 5 min and had eaten  $1.6 \pm 0.4$  g (mean  $\pm$  SEM,  $N=3$ ) after 20 min. Two animals did not eat Fonzie's during 20 min, but showed behavioural activation during Fonzie's presentation. After removal of Fonzie's, all animals displayed increased locomotion, sniffing, drinking for about 30-60 min. Dialysate DA was significantly elevated in all animals after presentation of Fonzie's ( $F_{(10,40)}=4.4059$ ;  $p=0.00034$ ; ANOVA followed by Dunnett's test;  $N=5$ ) (Fig. 3). DA dialysate levels in animals which did and did not eat Fonzie's did not differ significantly ( $F_{(1,3)}=0.05804$ ,  $p=0.82514$ ). In addition, Fonzie's feeding induced significant changes in dialysate DOPAC ( $F_{(10,30)}=10.579$ ,  $p<0.00001$ ) and HVA ( $F_{(10,30)}=3.8202$ ,  $p=0.00209$ ) concentrations. In comparison to HVA, elevation of DOPAC levels had a faster onset (Fig. 4).

### *Effects of handling on DA and metabolites in the GP.*

Most of the rats were inactive or sleeping before handling. During handling, rats rarely tried to escape from handling and remained inactive. Handling for 20 min resulted in a significant increase in pallidal DA ( $F_{(10,20)}=8.2346$ ,  $p=0.00004$ ; ANOVA followed by Dunnett's test;  $N=5$ ) to about 150 % of the basal values (Fig. 3). Furthermore, handling resulted in significant changes in dialysate DOPAC ( $F_{(10,40)}=5.0018$ ,  $p=0.00011$ ) and HVA ( $F_{(10,40)}=3.9941$ ,

$p=0.00078$ ) concentrations. Compared to HVA, elevation of DOPAC had a faster onset (Fig. 4).

*Effects of d-amphetamine and cocaine on DA and metabolites in the GP and NAcc.*

Perfusion of d-amphetamine or cocaine produced a dose-dependent increase in dialysate DA in the GP (d-amphetamine:  $F_{(17,34)}=25.711$ ,  $p<0.00001$ ; cocaine:  $F_{(17,34)}=71.673$ ,  $p<0.00001$ ) as well as in the NAcc (d-amphetamine:  $F_{(17,51)}=4.2176$ ,  $p=0.00003$ ; cocaine:  $F_{(17,51)}=13.423$ ,  $p<0.00001$ ) (Fig. 5). Perfusion of d-amphetamine had no effect on pallidal HVA ( $F_{(17,34)}=1.2588$ ,  $p=0.276$ ) whereas accumbal HVA was decreased ( $F_{(17,51)}=2.3657$ ,  $p=0.0093$ ). In contrast, d-amphetamine produced significant changes in dialysate DOPAC in the GP ( $F_{(17,17)}=5.7014$ ,  $p=0.00041$ ) and the NAcc ( $F_{(17,51)}=2.3657$ ,  $p=0.0093$ ) (Fig. 6). Perfusion of cocaine had no effect on pallidal or accumbal DOPAC (GP:  $F_{(17,34)}=3.5328$ ,  $p=0.00085$ ; NAcc:  $F_{(17,68)}=0.57$ ,  $p=0.902$ ) or HVA (GP:  $F_{(17,34)}=1.5202$ ,  $p=0.146$ ; NAcc  $F_{(17,68)}=0.857$ ,  $p=0.624$ ) (Fig. 7).

*Comparison between drug induced DA release in the GP and NAcc.*

ANOVA revealed no significant effect of target region (GP or NAcc) on dialysate DA levels in response to d-amphetamine ( $F_{(1,5)}=0.497280$ ,  $p=0.512$ ) or cocaine ( $F_{(1,5)}=0.52050$ ,  $p=0.503$ ). In addition, no significant differences between d-amphetamine and cocaine treatment were detected in the NAcc ( $F_{(1,6)}=2.951420$ ,  $p=0.137$ ). In contrast, GP dialysate DA levels were significantly different in response to d-amphetamine and cocaine treatment ( $F_{(1,4)}=78.02033$ ,  $p=0.00091$ ). Contrast analysis revealed differences for the sampling times from  $T=100$  min to  $T=260$  min corresponding to concentrations of 1, 10 and 100  $\mu\text{M}$ .

## **Discussion**

The main finding of our study is that the DA transmission in the GP is highly responsive to an aversive and rewarding stimulus as well as to psychostimulants. The pattern of pallidal DA release was similar to that observed in the NAcc.

*Basal DA dialysate levels.*

Basal dialysate DA levels measured in the GP were about 1.5-fold higher as in the NAcc. This does not necessarily reflect differences in the absolute extracellular concentrations in both structures which can be measured only by quantitative microdialysis (Parsons and Justice,



1994). In addition, respective comparisons are difficult because dialysate DA concentrations were not corrected for in vitro recovery and GP basal dialysate levels were biased as animals were excluded from evaluation due to very low dialysate DA levels.

*Responses to physiological stimuli.*

GP DA rapidly increased in response to appetitive, unfamiliar food (Fonzies) as demonstrated for the NAcc (Di Chiara, 1998; Bassareo and Di Chiara, 1999). Some rats did not eat Fonzies, however, they showed a similar increase in GP DA and metabolite levels as rats which ate Fonzies. These observations correspond with findings that novelty or unpredicted occurrence of stimuli are major factors to increase DA in the prefrontal cortex and NAcc (Feenstra et al., 1995; Feenstra and Botterblom, 1996; Redgrave et al., 1999). Furthermore, the present results confirm and extend our previous observations that eating of standard food pellets elicited a similar increase in GP DA levels (Hauber and Fuchs, 2000) as measured here. In this latter study the catecholamine reuptake inhibitor nomifensine was included to augment DA basal levels. Despite some minor methodological differences, our studies implicate that catecholamine reuptake inhibition does not interfere with the relative changes in extracellular DA in response to presentation of a food stimulus.

The aversive stimulus, i.e. handling, produced a significant increase of GP DA comparable to that observed in the NAcc: handling for 16 min produced a maximum increase in accumbal DA to 133 % of basal values (Feenstra et al., 1998, 1999). Likewise, restraint stress for 120 min produced an increase in NAcc DA to about 150 % of basal values (Imperato et al., 1991). The DA increase was accompanied by an elevation of DOPAC and HVA (Imperato et al., 1991; Feenstra et al., 1998) as shown in our present experiments. Thus our results demonstrate, that salient stimuli, either aversive or rewarding, elicit a prominent DA release in the GP.

The finding that an appetitive, unfamiliar stimulus as Fonzies elicited an increase of GP DA comparable to those in structures of the limbic network, e.g. NAcc or PFC (Kalivas and Nakamura, 1999) might be surprising because the GP is considered to be part of the motor circuit of basal ganglia (Alexander and Crutcher, 1990). However there is increasing evidence that sensorimotor subregions of the CPu are involved in processing of reward as well. For instance, feeding can be elicited by microinjection of opioid agonists into the CPu (Zhang and Kelley, 2000), while eating is inhibited by blockade of DA receptors in or lesions of the CPu (Salamone, 1994). Furthermore, neurons in the primate CPu responded to food reward stimuli in a similar manner as neurons in the NAcc (Schultz, 2000). Therefore the present findings

add further support to the notion that sensorimotor structures of the basal ganglia might be involved in neural reward processing (Kelley and Berridge, 2002).

*Responses to pharmacological stimuli.*

It is well documented that the physiological stimuli applied here stimulate DA release in the NAcc (e.g. Imperato et al., 1991; Di Chiara, 1998; Feenstra et al., 1998; Bassareo and Di Chiara, 1999; Feenstra et al., 1999). However, studies investigating the effects of cumulative administration of d-amphetamine or cocaine by reverse microdialysis in the NAcc with identical experimental conditions are lacking. Therefore we performed a complementary experiment in the NAcc. Application of d-amphetamine or cocaine in a broad range of concentrations produced a prominent and dose-dependent DA release in the GP and NAcc. In general, d-amphetamine had a greater potency than cocaine to increase extracellular DA. This might be due to d-amphetamine's dual mode of action, i.e. reuptake inhibition and reversal of reuptake (Zetterstrom et al., 1988; Arbuthnott et al., 1990; Bannon et al., 1995), while cocaine acts primarily via reuptake inhibition (Bannon et al., 1995; Carboni et al., 2001). The variance of d-amphetamine- and cocaine-induced DA release was higher in the NAcc compared to the GP. This might be due to the fact that I) most of our probes were localized in the NAcc shell, but a subset was positioned closer to the core, and, II) d-amphetamine and cocaine after systemic administration increased DA predominately in the NAcc shell, but not, or only moderately, in the core (Pontieri et al., 1995; Di Chiara, 1998, Hedou et al., 1999). Thus the small deviations in the probe positions in our experiment may account for the enhanced variability of DA release in the NAcc.

As the density of reuptake sites and DAergic terminals is much higher in the NAcc compared to the GP (Mennicken et al., 1992; Quik et al., 2000) one might expect that d-amphetamine and cocaine are less effective in the GP to increase DA levels. Our data contradict that assumption and suggest that the density of DAergic fibres and terminals is seemingly not correlated with the magnitude of stimulus-induced DA release. The pronounced DA release in the GP may be brought about by an effective DA synthesis and metabolism. Evidence in favour for this notion is provided by the response of dialysate DOPAC to d-amphetamine, which was different in the GP as compared to the NAcc. In line with earlier studies, we found that d-amphetamine perfusion decreased dialysate DOPAC in the NAcc (e.g. Zetterstrom et al., 1988; Carboni et al., 1989; Nomikos et al., 1990), while in the GP there was only a minor decrease. Extracellular DOPAC is formed from a cytoplasmatic pool of newly synthesized

DA and believed to reflect the rate of DA synthesis (Zetterstrom et al., 1988; Arbuthnott et al., 1990). Accordingly, the minor decrease of extracellular GP DOPAC after d-amphetamine might be due to a more effective DA synthesis and putatively higher cytoplasmatic DA concentration which compensates the d-amphetamine-induced continuous DA release from this pool. Therefore, the present data point to differences in DA synthesis between NAcc or CPu and the GP.

Taken together, DA transmission in an extrastriatal nucleus as the GP seems to be highly responsive to prototypical physiological and pharmacological stimuli known to activate mesolimbocortical DA neurons. Although the DAergic innervation of the GP was described as 'sparse' as compared to the striatal innervation (Rodrigo et al., 1998) the magnitude of the GP DA release is in a similar range as in the CPu or NAcc. The GP DA innervation is brought about by collaterals of the nigrostriatal pathway (Lindvall and Björklund, 1979). Recent studies further revealed two different arborization patterns of nigrostriatal axons: Most axons project directly to the striatum, where they branched abundantly. Other axons arborized profusely in extrastriatal structures, including the globus pallidus, but branched only sparsely in the striatum. This heterogeneous organization of the nigrostriatal projection has been proposed to allow a subset of nigral neurons to act directly upon the GP via a highly patterned set of collaterals (Gauthier et al., 1999). It is tempting to speculate that the GP DA measured here is released by the nigropallidal DA fibers which are at least in primates segregated to some extent from the nigrostriatal system (Smith and Kieval, 2000).

The fact that extracellular DA in the GP is highly responsive to physiological and pharmacological stimuli as shown here and modulates the activity of GP neurons and subsequently basal ganglia output structures (Hauber and Lutz, 1999) might have several important implications: 1. Effects (and side effects) of drugs for the treatment of schizophrenia and Parkinson's disease (PD) which alter DA transmission might involve actions on GP DA. This notion is supported by findings that the DAergic innervation of the GPe is severely affected in patients with PD (Hornykiewicz, 2001) and infusions of DA in the rat GP led to an improvement of motor symptoms in animal models of PD (Galvan et al., 2001). 2. DA, in particular in the NAcc shell, is a major substrate for the abuse liability and addictive properties of substances of abuse (Pontieri et al., 1995; Di Chiara, 1999). It remains elusive whether drug actions in extrastriatal regions as the GP contribute to their abuse potential. Recent findings that extrastriatal basal ganglia nuclei as the subthalamic nucleus play a role in control of appetitive behaviour (Baunez et al., 2002) and sensorimotor basal

ganglia nuclei might be also involved in neural reward processing (see Kelley and Berridge, 2002, for review) suggest that this notion deserves further consideration.

## References

- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-71.
- Arbuthnott GW, Fairbrother IS, Butcher SP (1990) Dopamine release and metabolism in the rat striatum: an analysis by 'in vivo' brain microdialysis. *Pharmacol Ther* 48:281-93.
- Arluison M, Dietl M, Thibault J (1984) Ultrastructural morphology of dopaminergic nerve terminals and synapses in the striatum of the rat using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry: a topographical study. *Brain Res Bull* 13:269-85.
- Bannon MJ, Granneman JG, Kapatos G (1995) The dopamine transporter. In: *Psychopharmacology: the fourth generation of progress* (Bloom FE, Kupfer DJ, eds), pp 179-188. New York: Raven Press Ltd.
- Bassareo V, Di Chiara G (1997) Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 17:851-61.
- Bassareo V, Di Chiara G (1999) Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci* 11:4389-4397.
- Baunez C, Amalric M, Robbins TW (2002) Enhanced food-related motivation after bilateral lesions of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 22:562-8.
- Carboni E, Imperato A, Perezzi L, Di Chiara G (1989) Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience* 28:653-61.
- Carboni E, Spielowoy C, Vacca C, Nosten-Bertrand M, Giros B, Di Chiara G (2001) Cocaine and amphetamine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens of mice lacking the dopamine transporter gene. *J Neurosci* 21:RC141: 1-4.
- Chesselet MF, Delfs JM (1996) Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci* 19:417-22.
- Ciliax BJ, Nash N, Heilman C, Sunahara R, Hartney A, Tiberi M, Rye DB, Caron MG, Niznik HB, Levey AI (2000) Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse* 37:125-45.
- Cossette M, Levesque M, Parent A (1999) Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neurosci Res* 34:51-4.
- Di Chiara G (1998) A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J Psychopharmacol* 12:54-67.
- Di Chiara G (1999) Drug addiction as dopamine-dependent learning disorder. *Eur J Pharmacol* 375:13-30.
- Fallon JH, Moore RY (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180:545-80.
- Feenstra MG, Botterblom MH, van Uum JF (1995) Novelty-induced increase in dopamine release in the rat prefrontal cortex in vivo: inhibition by diazepam. *Neurosci Lett* 189:81-4.
- Feenstra MG, Botterblom MH (1996) Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty. *Brain Res* 742:17-24.

- Feenstra MG, Botterblom MH, van Uum JF (1998) Local activation of metabotropic glutamate receptors inhibits the handling-induced increased release of dopamine in the nucleus accumbens but not that of dopamine or noradrenaline in the prefrontal cortex: comparison with inhibition of ionotropic receptors. *J Neurochem* 70:1104-13.
- Feenstra MG, Teske G, Botterblom MH, De Bruin JP (1999) Dopamine and noradrenaline release in the prefrontal cortex of rats during classical aversive and appetitive conditioning to a contextual stimulus: interference by novelty effects. *Neurosci Lett* 272:179-82.
- Galvan A, Floran B, Erlij D, Aceves J (2001) Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J Neural Transm* 108:153-66.
- Gauthier J, Parent M, Parent A (1999) The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res* 834:228-232.
- Hauber W, Lutz S (1999) Blockade of dopamine D2, but not of D1 receptors in the rat globus pallidus induced Fos-like immunoreactivity in the caudate-putamen, substantia nigra and entopeduncular nucleus. *Neurosci Lett* 271:73-6.
- Hauber W, Fuchs H (2000) Dopamine release in the rat globus pallidus characterised by in vivo microdialysis. *Behav Brain Res* 111:39-44.
- Hedou G, Feldon J, Heidbreder CA (1999) Effects of cocaine on dopamine in subregions of the rat prefrontal cortex and their efferents to subterritories of the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 372:143-55.
- Hornykiewicz O (2001) Chemical neuroanatomy of the basal ganglia-normal and in Parkinson's disease. *J Chem Neuroanat* 22:3-12.
- Imperato A, Puglisi-Allegra S, Casolini P, Angelucci L (1991) Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Res* 538:111-7.
- Kalivas PW, Nakamura M (1999) Neural systems for behavioral activation and reward. *Curr Opin Neurobiol* 9:223-7.
- Kelland MD, Soltis RP, Anderson LA, Bergstrom DA, Walters JR (1995) In vivo characterization of two cell types in the rat globus pallidus which have opposite responses to dopamine receptor stimulation: comparison of electrophysiological properties and responses to apomorphine, dizocilpine, and ketamine anesthesia. *Synapse* 20:338-50.
- Kelley AE, Berridge KC (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22:3306-11.
- Larson ER, Ariano MA (1995) D3 and D2 dopamine receptors: visualization of cellular expression patterns in motor and limbic structures. *Synapse* 20:325-37.
- Lindvall O, Björklund A (1979) Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 172:169-73.
- Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson SJ (1990) Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization- receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci* 10:2587-600.
- Mennicken F, Savasta M, Peretti-Renucci R, Feuerstein C (1992) Autoradiographic localization of dopamine uptake sites in the rat brain with 3H-GBR 12935. *J Neural Transm* 87:1-14.
- Mrzljak L, Bergson C, Pappy M, Huff R, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1996) Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 381:245-8.
- Nomikos GG, Damsma G, Wenkstern D, Fibiger HC (1990) In vivo characterization of locally applied dopamine uptake inhibitors by striatal microdialysis. *Synapse* 6:106-12.
- Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20:128-54.

- Parsons LH, Justice JB, Jr. (1994) Quantitative approaches to in vivo brain microdialysis. *Crit Rev Neurobiol* 8:189-220.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, New York: Academic Press.
- Pierce RC, Kalivas PW (1997) Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. *J Neurosci* 17:3254-61.
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the 'shell' as compared with the 'core' of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci* 92:12304-8.
- Quik M, Police S, He L, Di Monte DA, Langston JW (2000) Expression of D(3) receptor messenger RNA and binding sites in monkey striatum and substantia nigra after nigrostriatal degeneration: effect of levodopa treatment. *Neuroscience* 98:263-73.
- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K (1999) Is the short-latency dopamine response too short to signal reward error? *Trends Neurosci* 22:146-51.
- Richfield EK, Young AB, Penney JB (1987) Comparative distribution of dopamine D-1 and D-2 receptors in the basal ganglia of turtles, pigeons, rats, cats, and monkeys. *J Comp Neurol* 262:446-63.
- Rodrigo J, Fernandez P, Bentura ML, de Velasco JM, Serrano J, Uttenthal O, Martinez-Murillo R (1998) Distribution of catecholaminergic afferent fibres in the rat globus pallidus and their relations with cholinergic neurons. *J Chem Neuroanat* 15:1-20.
- Ruskin DN, Rawji SS, Walters JR (1998) Effects of full D1 dopamine receptor agonists on firing rates in the globus pallidus and substantia nigra pars compacta in vivo: tests for D1 receptor selectivity and comparisons to the partial agonist SKF 38393. *J Pharmacol Exp Ther* 286:272-81.
- Ruskin DN, Bergstrom DA, Kaneoke Y, Patel BN, Twery MJ, Walters JR (1999) Multisecond oscillations in firing rate in the basal ganglia: robust modulation by dopamine receptor activation and anesthesia. *J Neurophysiol* 81:2046-55.
- Salamone JD (1994) The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behav Brain Res* 61:117-33.
- Saura J, Kettler R, Da Prada M, Richards JG (1992) Quantitative enzyme radioautography with 3H-Ro 41-1049 and 3H-Ro 19-6327 in vitro: localization and abundance of MAO-A and MAO-B in rat CNS, peripheral organs, and human brain. *J Neurosci* 12:1977-99.
- Schultz W (2000) Multiple reward signals in the brain. *Nat Rev Neurosci* 1:199-207.
- Smith Y, Kieval JZ (2000) Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 23:S28-33.
- Zaborszky L, Cullinan WE (1996) Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. I. Dopamine-beta-hydroxylase- and tyrosine hydroxylase input to cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 374:535-54.
- Zetterstrom T, Sharp T, Collin AK, Ungerstedt U (1988) In vivo measurement of extracellular dopamine and DOPAC in rat striatum after various dopamine-releasing drugs; implications for the origin of extracellular DOPAC. *Eur J Pharmacol* 148:327-34.
- Zhang M, Kelley AE (2000) Enhanced intake of high-fat food following striatal mu-opioid stimulation: microinjection mapping and fos expression. *Neuroscience* 99:267-77.

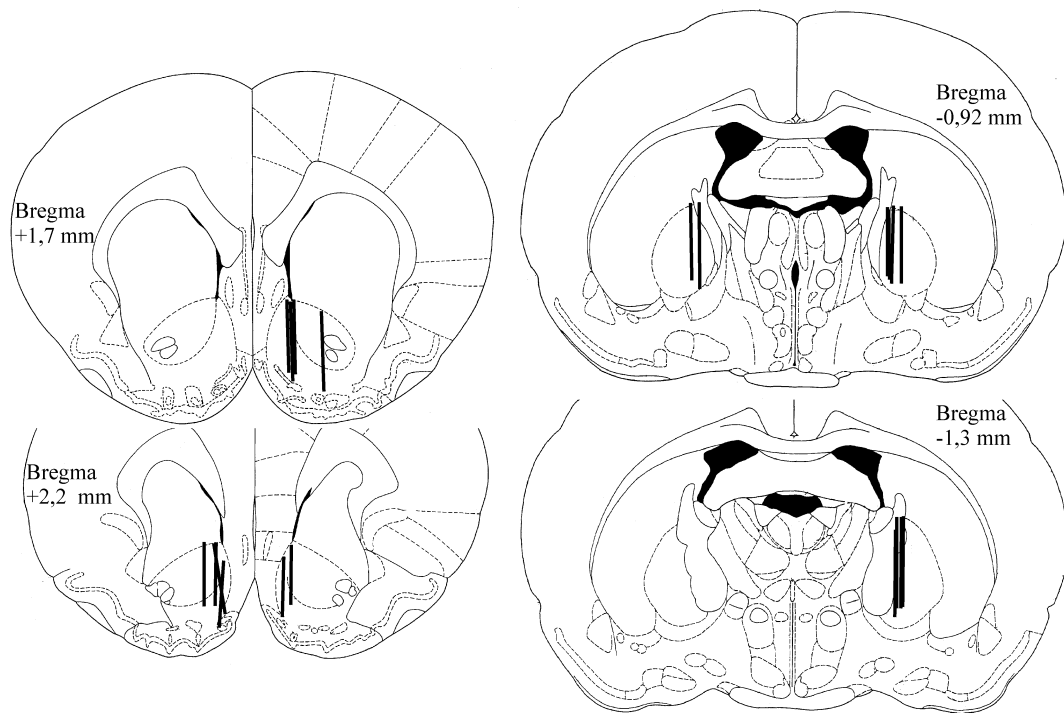


Fig. 1: Location of probes in the NAcc (left) or GP (right) reconstructed on the basis of coronal section according to the atlas of Paxinos and Watson (1986). Only the dialyzing part of the probe is shown in a representative plane. The distance from bregma is labelled in each section.

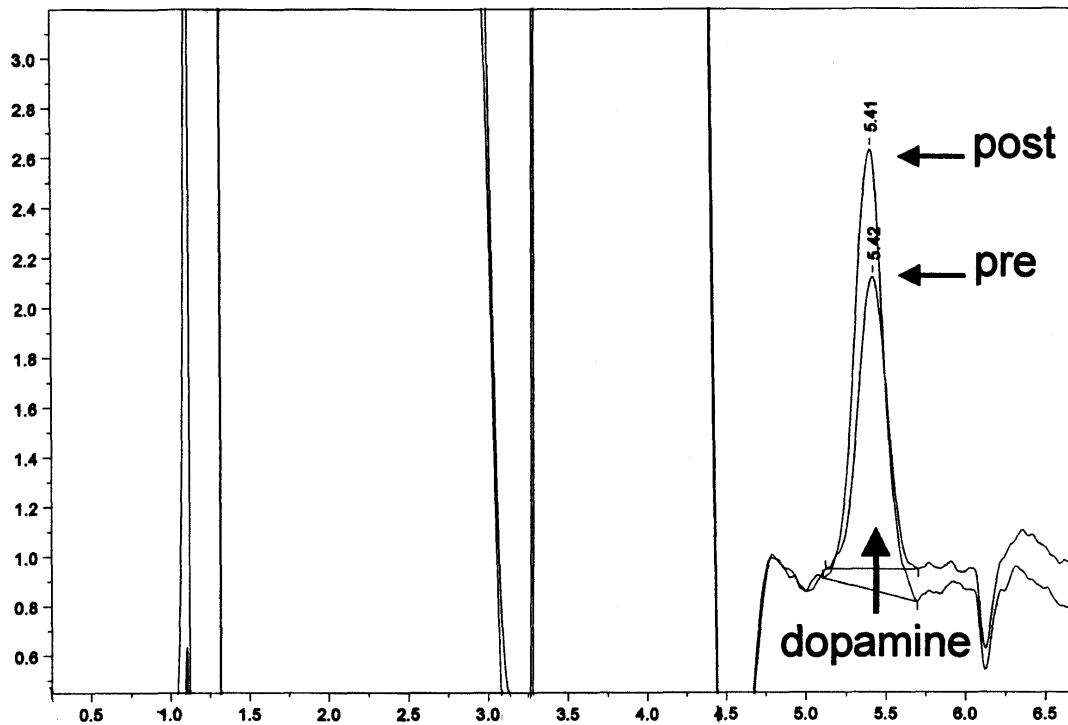


Fig. 2: Chromatogram obtained from GP dialysates of an animal before (pre) and after (post) handling. Calculated amounts of DA were 6.3 pg and 8.2 pg respectively, injection volume was 35  $\mu$ l. The chromatogram was recorded at an electrode potential of 600 mV against a Ag/AgCl<sub>2</sub>-reference electrode. 1 mV at the ordinate reflects a current of 0.01 nA and the abscissa represents the retention time in minutes.



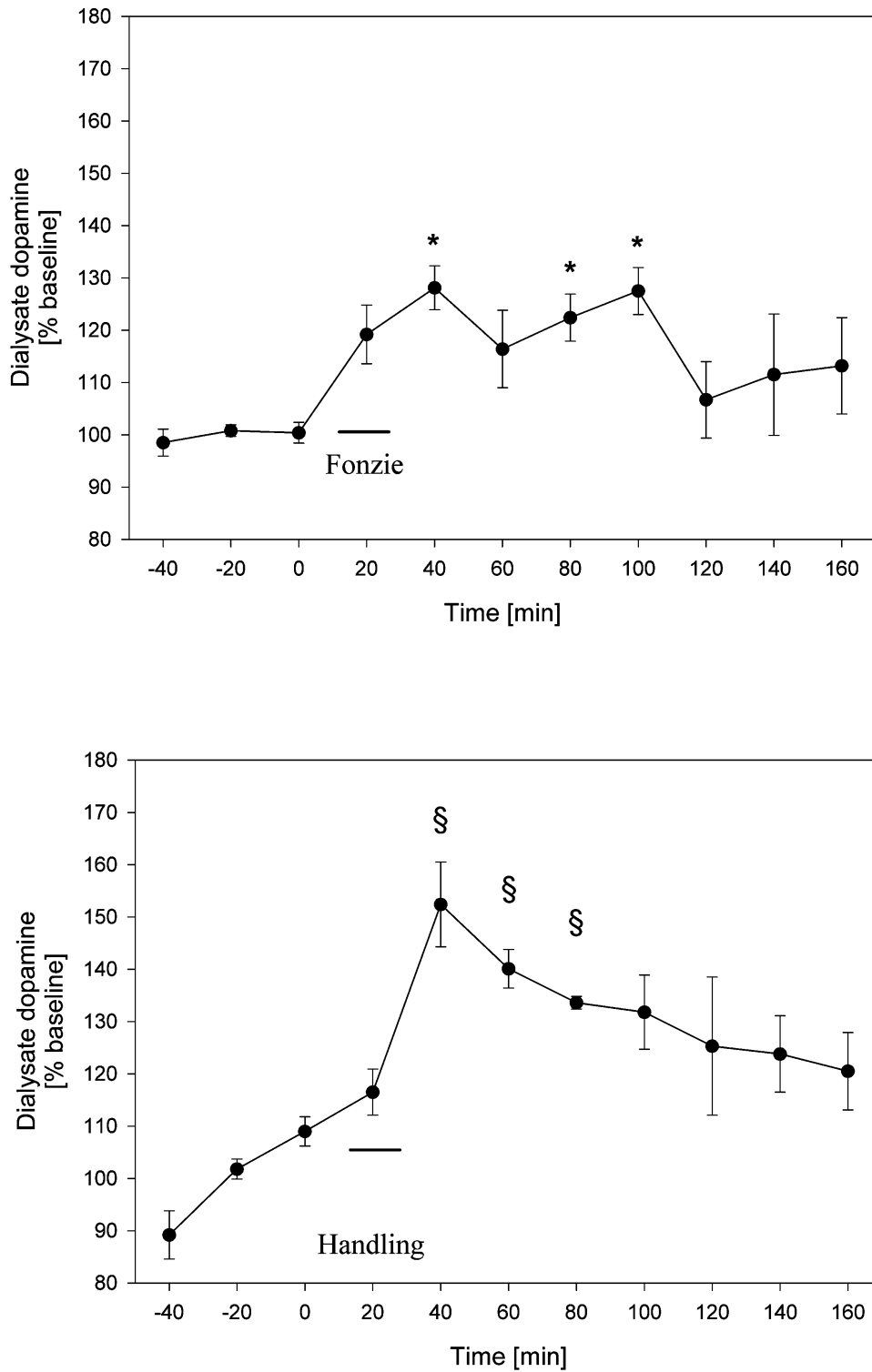


Fig. 3: Effect of feeding Fonzie (upper) and handling (lower panel) on dialysate DA levels in the GP. \* and § indicate significant differences compared to basal values (T=0 min, ANOVA followed by Dunnett's test with T=0 min as reference value).

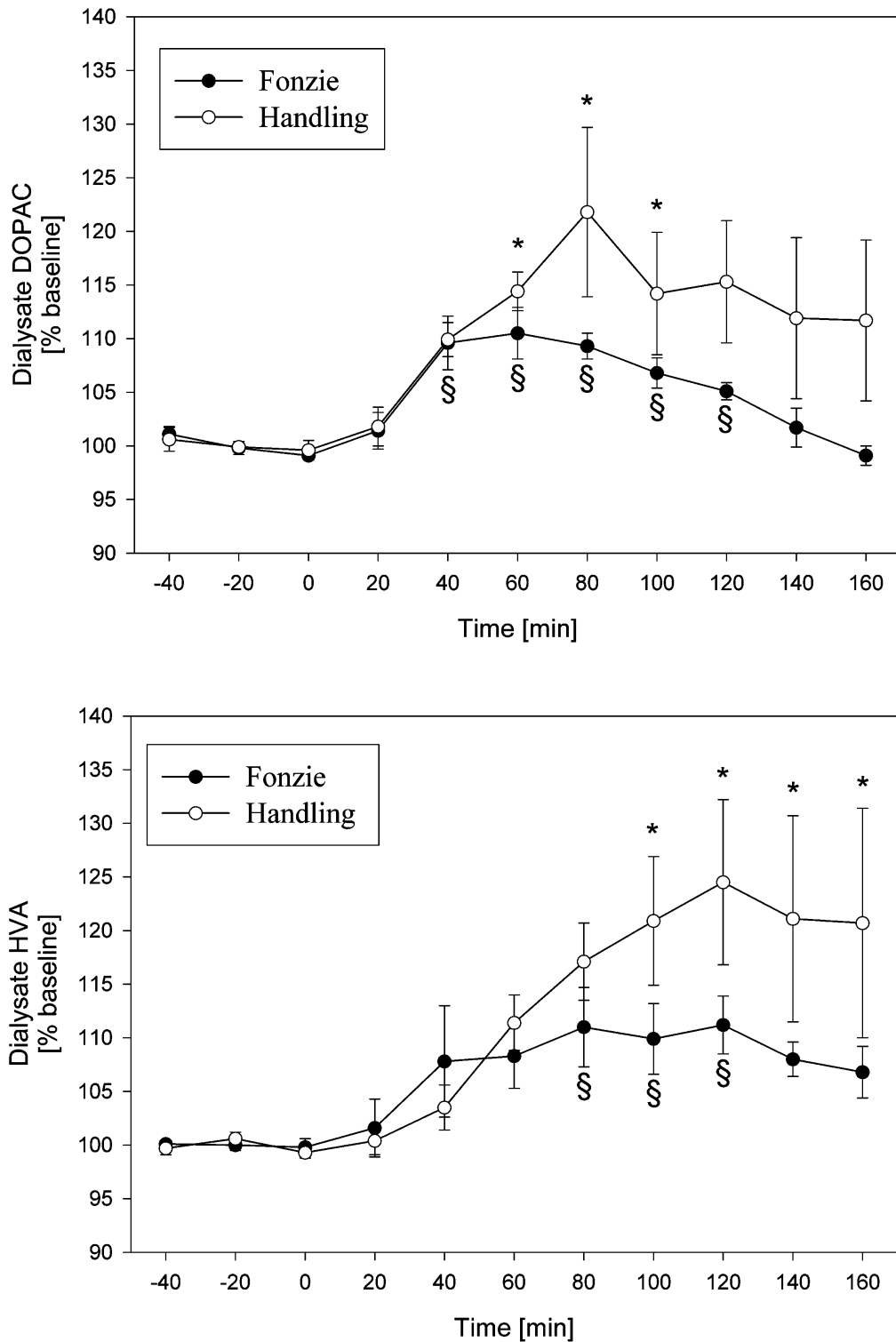


Fig. 4: Effect of feeding Fonzie and handling on dialysate DOPAC (upper) and HVA (lower panel) levels in the GP. \* and § indicate significant differences compared to basal values (T=0 min, ANOVA followed by Dunnett's test with T=0 min as reference value).

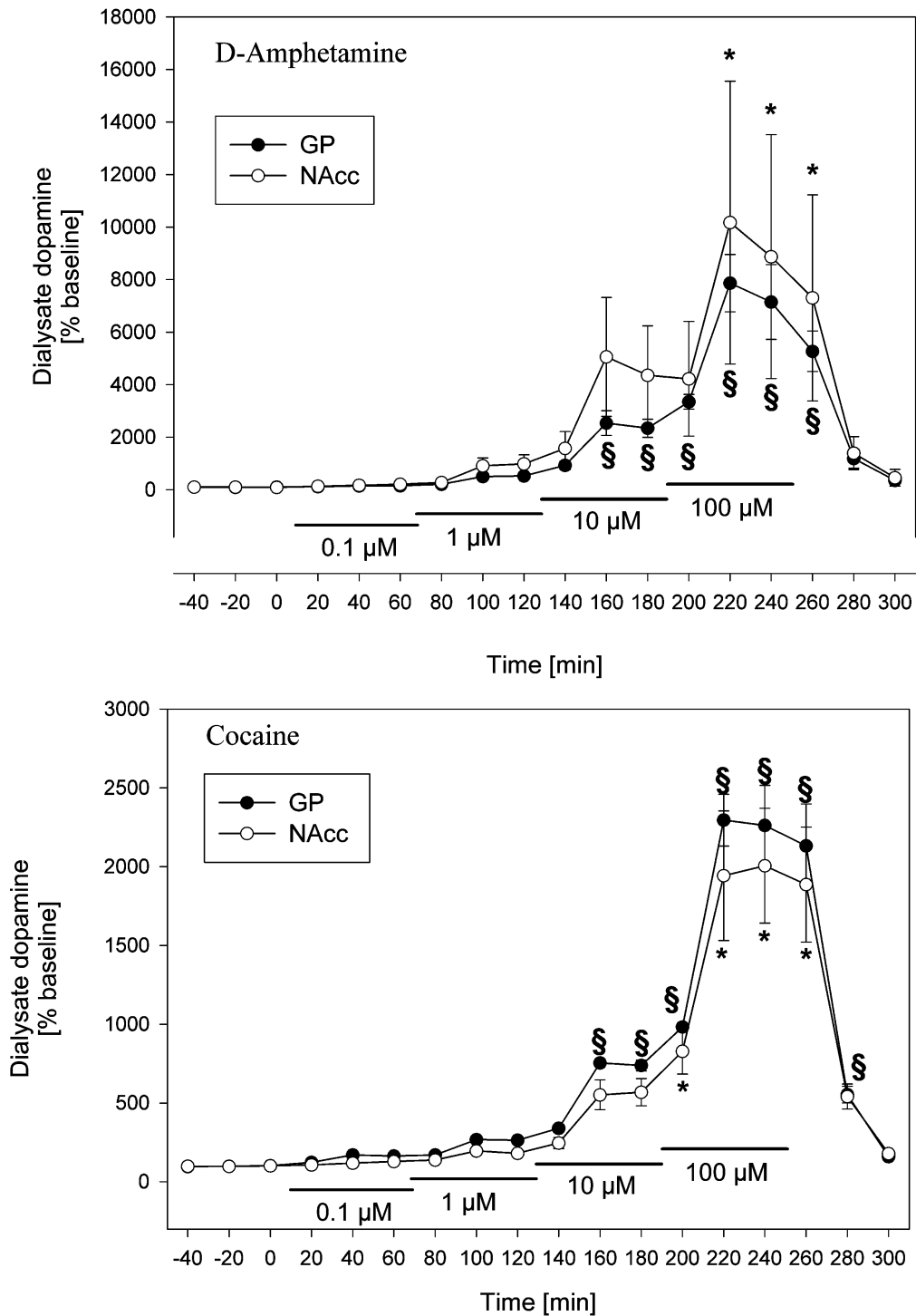


Fig. 5: Effect of perfusing d-amphetamine (upper) and cocaine (lower panel) on dialysate DA levels obtained from the GP (closed circles) and the NAcc (filled circles). \* and § indicate significant differences compared to the basal values (T=0 min) for the GP and NAcc respectively (ANOVA followed by Dunnett's test with T=0 min as reference).

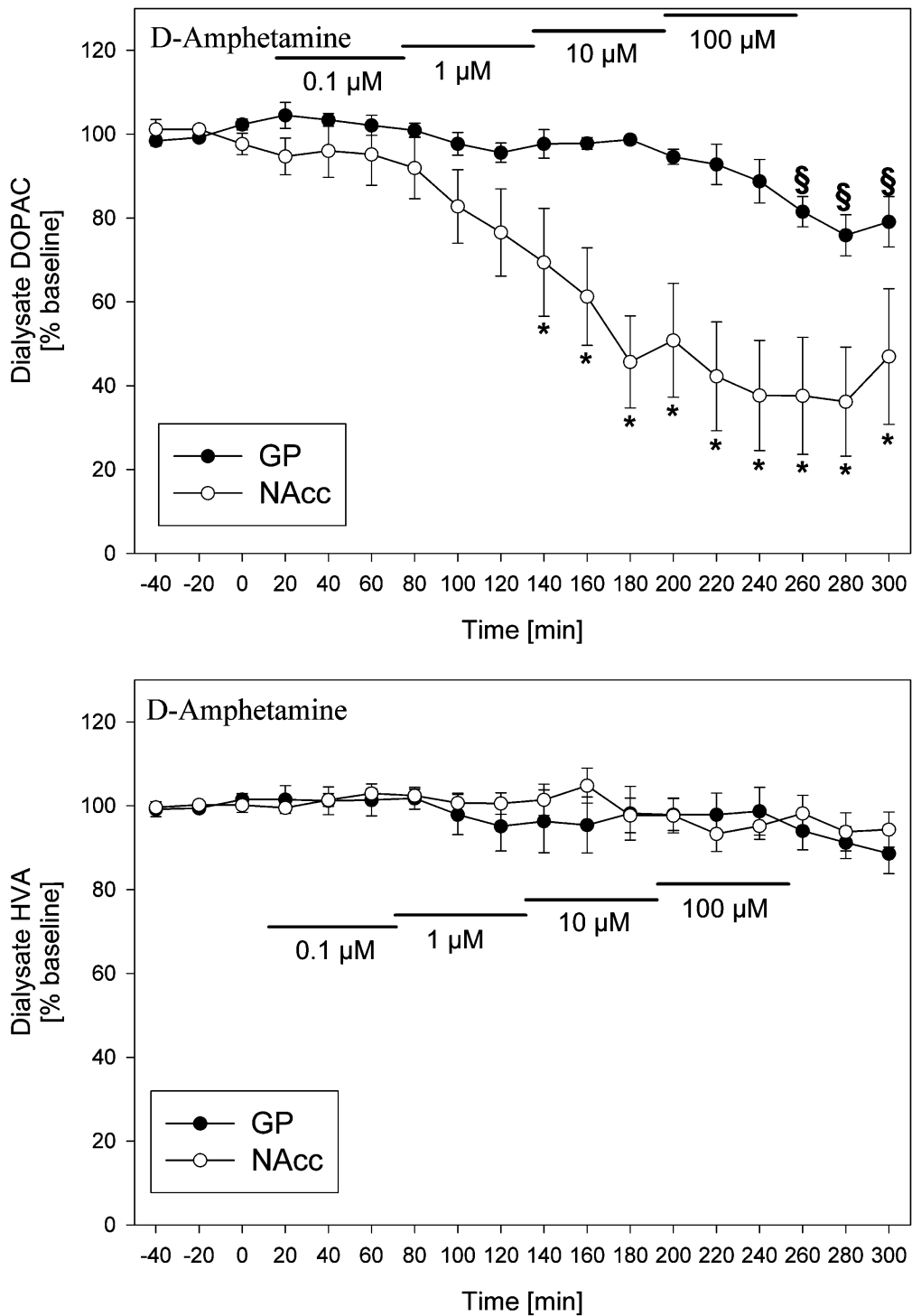


Fig. 6: Effect of perfusing d-amphetamine on dialysate DOPAC (upper) and HVA (lower panel) levels obtained from the GP (closed circles) and the NAcc (filled circles). \* and § indicate significant differences compared to the basal values (T=0 min) for the GP and the NAcc respectively (ANOVA followed by Dunnett's test with T=0 min as reference).

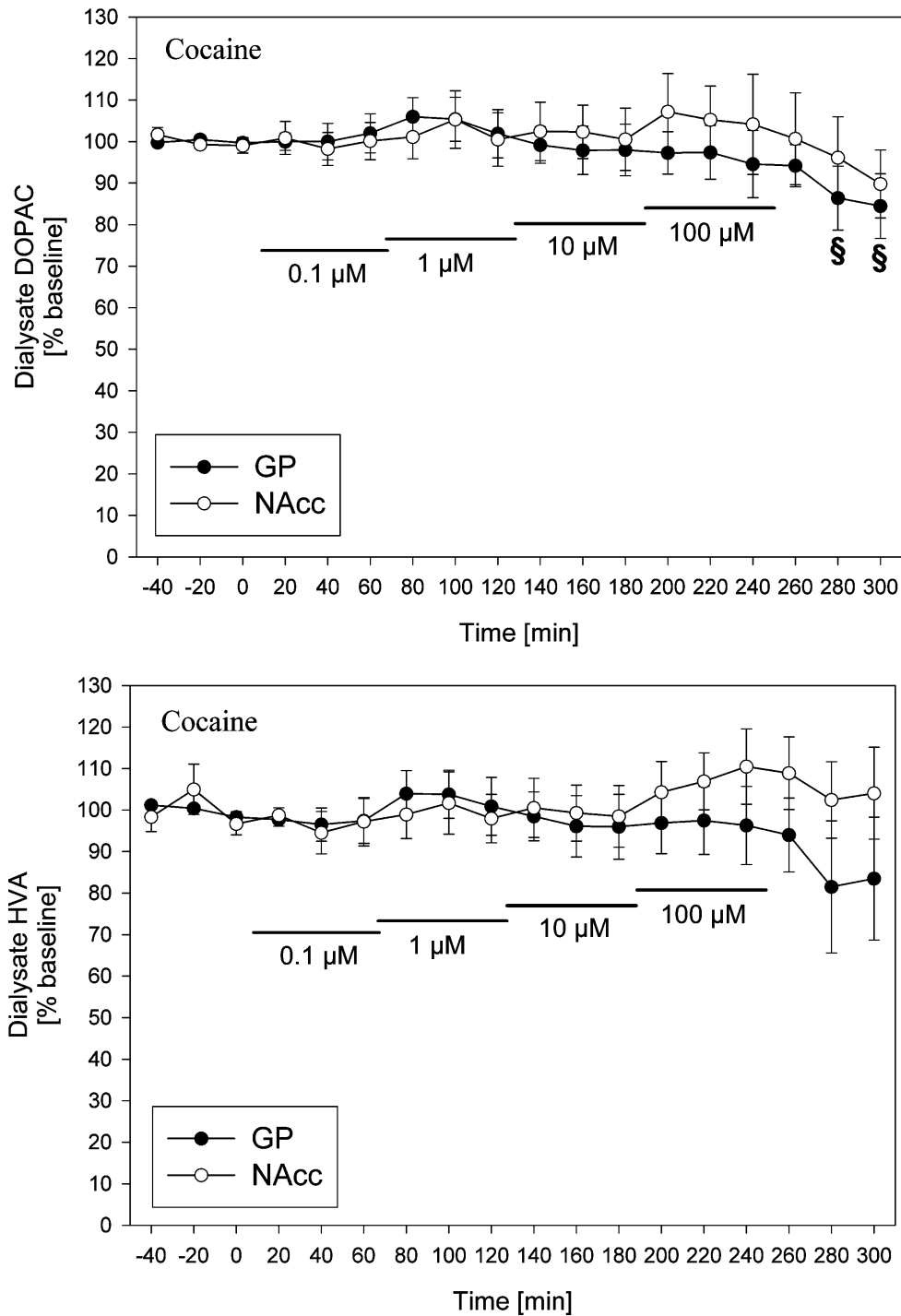


Fig. 7: Effect of perfusing cocaine on dialysate DOPAC (upper) and HVA (lower panel) levels obtained from the GP (closed circles) and the NAcc (filled circles). § indicate significant differences compared to the basal values (T=0 min) for the GP (ANOVA followed by Dunnett's test with T=0 min as reference).

**Increased dopamine after reverse microdialysis  
of NMDA and AMPA in the rat globus pallidus**

Holger Fuchs and Wolfgang Hauber

Abteilung Tierphysiologie, Biologisches Institut

Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57

D-70550 Stuttgart, Germany

Correspondence to: Dr. W. Hauber; Abt. Tierphysiologie, Biologisches Institut, Universität  
Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70550 Stuttgart; Germany; Phone: +49-711-685-5003, Fax:  
+49-711-685-5090; E-Mail: [Hauber@po.uni-stuttgart.de](mailto:Hauber@po.uni-stuttgart.de)

## **Abstract**

The globus pallidus receives dopaminergic input by collaterals from the nigrostriatal pathway. However, the neurochemical regulation of extracellular dopamine in this nucleus is unknown. The present study examined whether activation of ionotropic glutamate receptors elicits changes in extracellular dopamine in the globus pallidus. Results show that reverse microdialysis of 70  $\mu$ M AMPA or of 1 mM NMDA produced a significant and reversible increase of dialysate dopamine levels to about 130% and 160%, respectively. These data provide the first evidence that ionotropic glutamate receptors in the globus pallidus exert excitatory actions on dopamine release which might be brought about by actions on presynaptic ionotropic glutamate receptors in the globus pallidus or involve stimulation of midbrain dopamine neurons through trans-synaptic pathways.

**Key words:** glutamate, extrastriatal dopamine, MK-801, dizocilpine, ionotropic glutamate receptor, subthalamic nucleus

## **Introduction**

The globus pallidus (GP) and the subthalamic nucleus (STh) are part of the basal ganglia's indirect pathway connecting the striatum with the substantia nigra pars reticulata (SNr) and the nucleus entopeduncularis (EP). There is increasing evidence that the GP and STh are not only relaying striatal information to the SNr/EP, but play a central role in basal ganglia information processing [1, 2]. Both nuclei are tightly interconnected [3] and form a central pacemaker within the basal ganglia responsible for synchronized oscillatory activity in normal and pathological conditions [4].

The GP receives massive GABAergic inputs from the striatum and a prominent glutamatergic input from STh [5]. GABA and glutamate both have been detected extracellularly in the GP using in vivo microdialysis [6-8]. In addition, collaterals from the nigrostriatal pathway provide a dopamine (DA) innervation of the GP [9]. Extracellular DA in the GP is responsive to biologically significant stimuli and psychostimulant drugs [10, Fuchs et al., Fuchs and Hauber in submission] and involved in motor control [11].

The neurochemical regulation of extracellular DA in the GP is unknown at present. Recent findings suggest a major role of ionotropic glutamate receptors in regulation of extracellular DA in the ventral pallidum [12]. By analogy extracellular glutamate in the GP [8] by acting on AMPA and NMDA receptors might control DA levels in the GP. To test this hypothesis,

we analysed the effects of reverse microdialysis of NMDA and AMPA on extracellular DA in the GP using in vivo-microdialysis in freely moving rats.

### **Materials and Methods**

Male CD rats (Charles River, Sulzfeld, Germany) were used for all experiments and housed in groups up to five animals in transparent Macrolon® cages (type IV; 35 x 55 x 10 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) until surgery. Temperature ( $20\pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $50\pm 10\%$ ) were kept constant in the animal house and a 12:12-h light-dark schedule was maintained. Rats were given *ad libitum* access to water. Food (standard maintenance chow, Altromin, Lage, Germany) was restricted to 15 g per day and animal. Experiments were conducted in accordance with the German Law on Animal Protection and approved by the proper authorities in Stuttgart, Germany.

For stereotaxic surgery, animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) following pretreatment with atropine sulphate (0.5 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and secured in a Kopf stereotaxic apparatus (Kopf Instruments, Tujunga, USA). Animals weighing 225-290 g were implanted unilaterally with intracranial guide cannulae (MAB 6.14.IC, Microbiotech/se, Stockholm, Sweden) aiming to the GP at the following coordinates [13]: AP -1.1 mm L 2.5 mm and V -4.5 mm (from dura). After the surgery rats were housed individually in Macrolon® cages (type III; 37 x 21 x 30 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) with raised solid-walled lids. Each rat was given at least one week to recover from surgery. The microdialysis experiment was performed in the home cage of the animal with the lid replaced by a metal frame bearing a counterbalanced arm with a dual channel swivel (375/D22/QM, Instech Labs., Plymouth Meeting, USA)

A microdialysis probe (MAB 6.14.2, Microbiotech/se, Stockholm, Sweden) with an exposed membrane length of 2 mm was inserted through the guide cannula at least five hours before sampling of the first baseline value and perfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) ( $145\text{ mM Na}^+$ ,  $2.5\text{ mM K}^+$ ,  $0.9\text{ mM Mg}^{2+}$  and  $2.4\text{ mM Ca}^{2+}$ ) delivered by a CMA/100 microdialysis pump (CMA, Solna, Sweden) at  $2.0\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$ . Samples were collected every 30 min. ACSF contained  $3\text{ }\mu\text{M}$  nomifensine (RBI, Natick, USA), a catecholamine reuptake inhibitor. (S)-AMPA (Tocris; Ballwin, USA) and NMDA (Sigma-Aldrich; Deisenhofen, Germany) and MK801 (RBI, Natick, USA) were administered by reverse microdialysis.



Dialysates were analyzed for DA, DOPAC and HVA using HPLC with electrochemical detection. The mobile phase consisted of 2 g/l sodium-acetate, 5 g/l citric acid, 400-500 mg/l 1-heptanesulfonic acid, 110 mg/l Na<sub>2</sub>-EDTA and 12.5 % (v/v) methanol with pH at 4.2 before methanol addition. Minor modifications of the concentrations of HSA and methanol were made to optimize DA peak separation if necessary. The HPLC apparatus consisted of a Flux Rheos 2000 pump (Flux Instruments, Basel, Switzerland), a refrigerated CMA/200 autosampler (CMA, Solna, Sweden), a Nucleosil C18 column (Bischoff, Leonberg, Germany; 5 µm particles, length x i.d. 125 x 3 mm) and a dual electrode BAS LC4C amperometric detector (Bioanalytical Systems, Lafayette, USA). The detection limit of DA in a standard solution was routinely about 2 pg per injection or lower.

After the experiments, animals were killed, the brains removed, fixed for at least 2 h in formalin and immersed in 30 % (w/v) sucrose for several days. Cryosections (60 µm) were taken and stained with cresyl violet. Only data from animals with correct probe location, i.e. most of the exposed dialysis membrane located within the GP, were evaluated.

Data are expressed as percentages of control values ( $\pm$  standard error of the mean, SEM). The average concentration of the three samples before drug administration was taken as control and set to 100 %. These data were analyzed by a nonparametric one-way ANOVA for repeated measurements followed by Dunnett's multiple comparisons test with the last baseline sample as reference.  $P < 0.05$  was considered to represent significant differences.

## Results

Basal DA levels in the GP (N=16 animals) were  $29.3 \pm 3.3$  pg/60 µl (mean  $\pm$  SEM from of all baseline samples before drug application, N=48). Reverse microdialysis with aCSF containing either 70 µM AMPA or 1 mM NMDA produced transient increase of dialysate DA levels to about 130% and 160%, respectively (AMPA:  $F_{11,55}=2.7238$ ,  $p < 0.007$ ; NMDA:  $F_{11,33}=5.3701$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figs. 1 and 2). Reverse microdialysis of 500 µM MK801 failed to alter GP dialysate DA levels significantly ( $F_{12,48}=0.8478$ ,  $p=0.60266$ , data not shown).

## Discussion

The present study demonstrates an enhancement of GP DA release after local activation of AMPA and NMDA receptors thus providing the first evidence that ionotropic glutamate receptors in the GP exert excitatory actions on DA release.

One mechanisms which might account for the AMPA- and NMDA-induced GP DA release is an activation of presynaptic glutamate receptors on nigropallidal dopamine afferents. Direct

neuroanatomical evidence for a presynaptic expression of NMDA and AMPA receptors on GP DA terminals is missing. However, ionotropic glutamate receptors in the substantia nigra are involved in control of striatal DA release [14]. Furthermore, striatal NMDA and AMPA receptors serve as heteroreceptors in the striatum [15] and their stimulation has been found to increase striatal DA [16, 17]. Furthermore, reverse microdialysis of similar concentrations of NMDA and AMPA into the ventral pallidum produced a significant DA release [12]. Thus presynaptic ionotropic receptors on GP DA fibers might account for the NMDA- and AMPA-induced DA release measured here. An other mechanism mediating AMPA- and NMDA-induced DA release in the GP might involve trans-synaptic effects through the midbrain. The GP exerts a powerful control on midbrain DA neurons as chemical stimulation of GP neurons by local blockade of GABA receptors resulted in an increase in the activity of SNc DA neurons [18]. This effect is most likely mediated through a disynaptic pathway involving the SNr [18]. In view of this hypothesis, it is conceivable that NMDA or AMPA administered by reverse microdialysis stimulates NMDA and AMPA receptors co-localized on pallidal neurons [19]. This would result in a trans-synaptic activation of SNc DA neurons which, in turn, stimulates DA release in the terminal regions of DAergic fibres including the GP. Irrespective of the precise neurochemical mechanisms involved the present data suggest that ionotropic glutamate receptors in the GP exert excitatory actions on DA release. Our finding that reverse microdialysis of an NMDA receptor antagonist did not change GP DA levels suggest that there is no tonic stimulation of NMDA receptors in the GP. Preliminary studies also failed to detect a tonic stimulation of AMPA receptors in the GP as reverse microdialysis of CNQX had no effects DA release (Fuchs, unpublished observations). Accordingly, reverse microdialysis of NMDA and AMPA receptor antagonists into the ventral pallidum had no effect on DA release [12].

The glutamate-dopamine interactions in the GP observed here provide a mechanism to act on extracellular GABA in the GP. The enhanced pallidal DA efflux induced by NMDA and AMPA receptor activation might led to a decrease of GP GABA release as shown to occur after stimulation of presynaptic D2 receptors located on striatopallidal afferents [20]. In line with such a regulation, unilateral lesion of nigral DA neurons produced the opposite effect, i.e. an increase of GP GABA levels [6]. Thus, as a consequence of elevated pallidal dopamine levels the influence of GABAergic inputs from the striatum would be diminished, the influence of glutamatergic signals originating predominantly from subthalamopallidal afferents [8] increased. Enhanced DA levels in the nucleus accumbens have been proposed to regulate preferred access of afferent input to control adaptive behavioural responses [21].

Correspondingly, an increased GP DA efflux might be involved in an input selection mechanism which ensures preferential responding of GP neurons to signals conveyed by subthalamopallidal inputs and inhibits responding to striatopallidal inputs. This mechanism could be important to adjust behaviour in the presence of biologically significant stimuli in the environment such as food which elicit an increase of extracellular glutamate in the GP [22].

### **Conclusions**

Using in vivo microdialysis the present data reveal that local activation of AMPA- and NMDA- receptors stimulated GP DA efflux thus providing the first evidence that ionotropic glutamate receptors in the GP exert excitatory actions on DA release. The DA release might be brought about by actions on presynaptic ionotropic glutamate receptors in the GP and/or might involve stimulation of midbrain DA neurons through trans-synaptic pathways. It is speculated that an increased DA efflux in the GP might inhibit access of striatopallidal signals to GP neurons, i.e. subserves input selection.

### **Acknowledgements**

Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ha 2340/4-2). This publication is part of the PhD thesis of H.F.

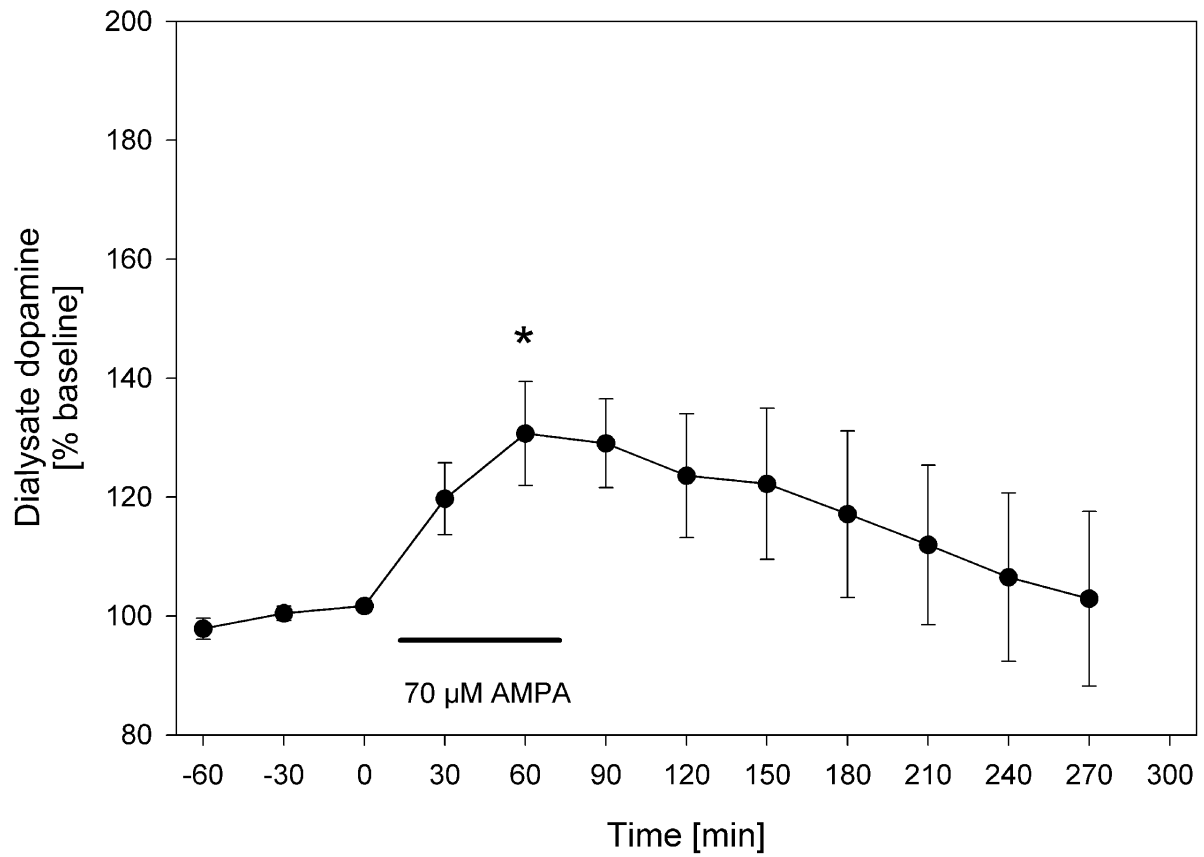


Fig. 1: Effect of reverse microdialysis of 70 μM AMPA for 60 min on GP dialysate dopamine levels (mean ± SEM). Time of drug delivery is indicated by a solid line, \* P<0.05 vs. T=0 min, ANOVA and post-hoc Dunnett's test.

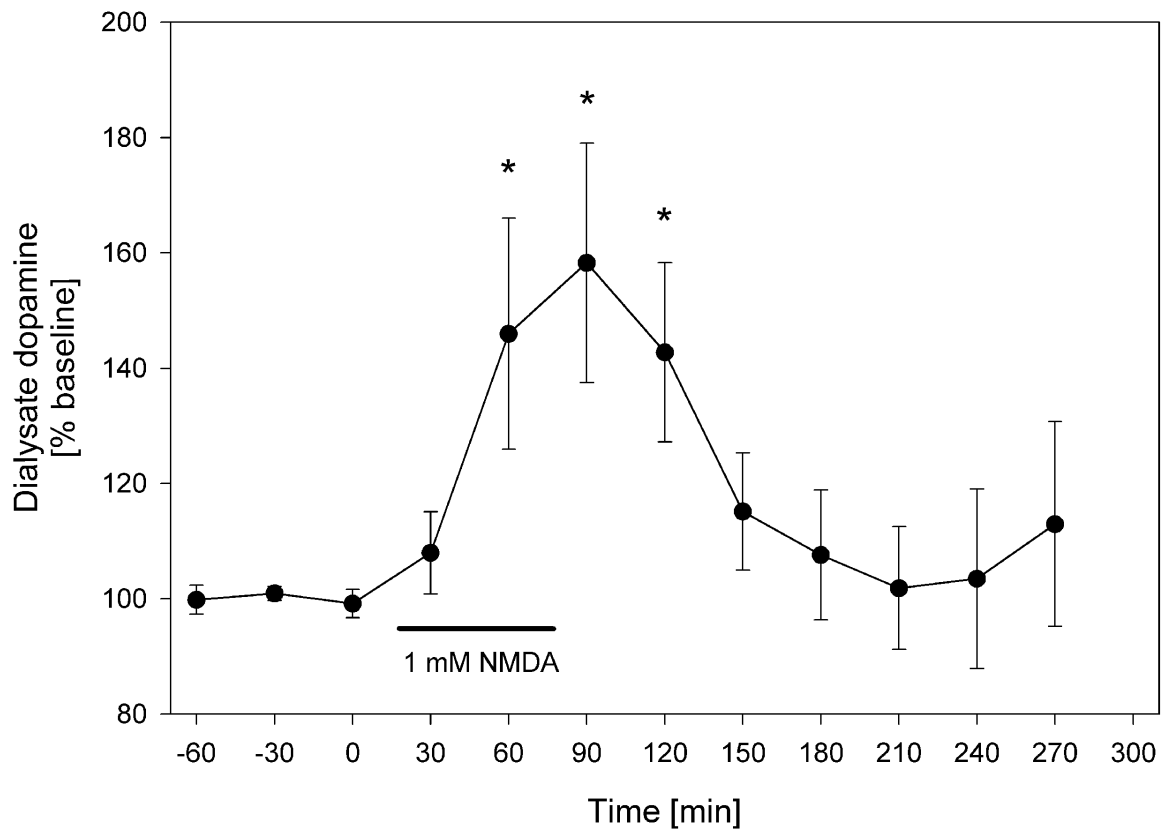


Fig. 2: Effect of reverse microdialysis of 1 mM NMDA for 60 min on GP dialysate dopamine levels (mean  $\pm$  SEM). Time of drug delivery is indicated by a solid line, \*  $P < 0.05$  vs. T=0 min, ANOVA and post-hoc Dunnett's test.

## References

1. Parent A and Hazrati LN. *Brain Res Brain Res Rev*, **20**(1): 128-54 (1995).
2. Chesselet MF and Delfs JM. *Trends Neurosci*, **19**(10): 417-22 (1996).
3. Shink E, Bevan MD, Bolam JP, and Smith Y. *Neuroscience*, **73**(2): 335-57. (1996).
4. Plenz D and Kitai ST. *Nature*, **400**(6745): 677-82 (1999).
5. Fonnum F, Gottesfeld Z, and Grofova I. *Brain Res.*, **143**: 125-138 (1978).
6. Segovia J, Tossman U, Herrera-Marschitz M, Garcia-Munoz M, and Ungerstedt U. *Neurosci Lett*, **70**(3): 364-8 (1986).
7. Drew KL, O'Connor WT, Kehr J, and Ungerstedt U. *Eur J Pharmacol*, **187**(3): 385-97 (1990).
8. Windels F, Bruet N, Poupard A, Urbain N, Chouvet G, Feuerstein C, and Savasta M. *Eur J Neurosci*, **12**(11): 4141-4146 (2000).
9. Lindvall O and Björklund A. *Brain Res*, **172**(1): 169-73 (1979).
10. Hauber W and Fuchs H. *Behav Brain Res*, **111**(1-2): 39-44 (2000).
11. Hauber W and Lutz S. *Behav Brain Res*, **106**(1-2): 143-50 (1999).
12. Kretschmer BD. *J Neurochem*, **73**(2): 839-48 (1999).
13. Paxinos G and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, New York: Academic Press; 1986.
14. Westerink BH, Santiago M, and De Vries JB. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **346**(6): 637-43 (1992).
15. Tarazi FI, Campbell A, Yeghiayan SK, and Baldessarini RJ. *Synapse*, **30**(2): 227-35. (1998).
16. Zigmond MJ, Castro SL, Keefe KA, Abercrombie ED, and Sved AF. *Amino Acids*, **14**(1-3): 57-62 (1998).
17. Kendrick KM, Guevara-Guzman R, de la Riva C, Christensen J, Ostergaard K, and Emson PC. *Eur J Neurosci*, **8**(12): 2619-34. (1996).
18. Celada P, Paladini CA, and Tepper JM. *Neuroscience*, **89**(3): 813-25 (1999).
19. Bernard V and Bolam JP. *Eur J Neurosci*, **10**(12): 3721-36. (1998).
20. Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, and Watson SJ. *J Neurosci*, **10**(8): 2587-600 (1990).
21. Floresco SB, Blaha CD, Yang CR, and Phillips AG. *J Neurosci*, **21**(8): 2851-60. (2001).
22. Perez J, Colasante C, Tucci S, Hernandez L, and Rada P. *Brain Res*, **877**(1): 91-4. (2000).

## **Changes in extracellular dopamine in the rat globus pallidus induced by typical and atypical antipsychotic drugs**

Holger Fuchs and Wolfgang Hauber

Abteilung Tierphysiologie, Biologisches Institut  
Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57  
D-70550 Stuttgart, Germany

**Key words:** clozapine, haloperidol, raclopride, microdialysis, extrastriatal dopamine, pallidum, neuroleptics

Correspondence to: Dr. W. Hauber; Abt. Tierphysiologie, Biologisches Institut, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70550 Stuttgart; Germany; Phone: +49-711-685-5003, Fax: +49-711-685-5090; E-Mail: [Hauber@po.uni-stuttgart.de](mailto:Hauber@po.uni-stuttgart.de)

## **Abstract**

Typical antipsychotic drugs (APD) with a high extrapyramidal motor side effect liability are known to markedly stimulate extracellular dopamine (DA) in the caudate-putamen, while atypical APD with a lower incidence of extrapyramidal motor side effects have less pronounced stimulating actions. Thus it has been hypothesized that the ability of APD to increase extracellular DA in the caudate-putamen is correlated with their extrapyramidal motor side effect liability. The present study sought to determine whether extracellular DA in the globus pallidus (GP) might be another indicator to differentiate neurochemical actions of typical and atypical APD. Using *in-vivo* microdialysis we compared the effects of typical and atypical APD after systemic administration and after reverse microdialysis into the GP. Results show that systemic administration of haloperidol (1 mg/kg i.p.) and clozapine (20 mg/kg i.p.) both induced a significant DA release to about 160% and 180% of baseline, respectively. Furthermore, raclopride and clozapine applied via reverse microdialysis in a cumulative dosing regimen (1  $\mu$ M - 1000  $\mu$ M) did not stimulate extracellular DA in the GP over wide range of concentrations. However, in the highest concentration (1000  $\mu$ M) raclopride and clozapine significantly induced a pallidal DA release to about 130% and 300% of baseline values, respectively. As typical and atypical APD produced very similar changes in extracellular DA in the GP, effects on pallidal DA induced by APD seems not be correlated with their different extrapyramidal motor side effect liability.



## **Introduction**

Administration of typical antipsychotic drugs (APD) used for the treatment of schizophrenia and other psychotic disorders is accompanied by extrapyramidal motor side effects. Typical APD, e.g. haloperidol, have a high liability for extrapyramidal motor side effects (Seeman and Van Tol 1994), while the incidence of extrapyramidal motor side effects is low with atypical APD, e.g. clozapine (Coward 1992; Meltzer et al. 1999). A large number of studies have been devoted to differentiate the sites and mechanisms of actions of typical and atypical APD. All APD stimulate dopamine (DA) release in the caudate-putamen, nucleus accumbens and prefrontal cortex (e.g. Moghaddam and Bunney 1990) probably reflecting a feedback response to the blockade of D2 receptors (Westerink et al. 2001). However, the regional pattern differs as atypical APD have more prominent actions on extracellular DA in the nucleus accumbens and prefrontal cortex than in the caudate-putamen, while typical APD have stronger effects in the caudate-putamen (Moghaddam and Bunney 1990; Volonte et al. 1997). It has been suggested that the less marked actions of atypical APD within the caudate-putamen might account for the lower incidence of extrapyramidal side effects (Moghaddam and Bunney 1990; Volonte et al. 1997; Seeman 2001). Accordingly, there is a large body of evidence from studies using induction of various immediate early genes as a marker of neuronal activity that typical APD produced prominent c-Fos expression in the caudate-putamen, while atypical APD induced a weaker c-Fos response (e.g. Nguyen et al. 1992; Robertson and Fibiger 1992; Bubser and Deutch 2002).

Most studies addressing possible sites mediating extrapyramidal side effects have been focused on the caudate-putamen and the nigrostriatal system. However, there are other basal ganglia candidate structures as the globus pallidus (GP) which receive DAergic input and play a prominent role in motor control. The GP receives a DAergic innervation arising from substantia nigra pars compacta neurons (Fallon and Moore 1978; Lindvall and Björklund 1979). The release of DA in the GP is calcium-dependent and tetrodotoxin-sensitive (Hauber and Fuchs 2000; Fuchs and Hauber 2002) and responsive to psychostimulants (Fuchs and Hauber, in submission). In addition, systemic and intra-GP infusion of D2 receptor antagonists increased expression of c-Fos in the globus pallidus (Ruskin and Marshall 1997; Marshall et al. 2001). Furthermore, an intra-GP infusion of DA receptor antagonists produced massive akinesia (Costall et al. 1972; Hauber and Lutz 1999) suggesting that defective DAergic transmission in the GP might contribute to extrapyramidal motor side effects. Recent studies further revealed that extracellular GABA in the GP is increased after systemic administration of haloperidol, but decreased after systemic administration of clozapine

(Chapman and See 1996). In functional models of the basal ganglia extracellular levels of GABA have been linked with akinesia (Albin et al. 1989). Thus differential neurochemical actions of typical *vs.* atypical APD in the GP might be related to their differential extrapyramidal motor side effects liability (See and Berglind 2001).

The present study sought to determine whether extracellular DA in the GP may be an indicator to differentiate neurochemical actions of atypical and typical APD. Using *in vivo* microdialysis we investigated whether systemic administration of typical APD have stronger stimulating effects on extracellular GP DA as atypical APD as previously shown to occur in the caudate-putamen. Furthermore, we analyzed by reverse microdialysis whether such effects are mediated by local actions of typical and atypical APD in the GP.

## Material and Methods

### Subjects

Male CD rats (Charles River, Sulzfeld, Germany) were housed in groups up to five animals in transparent Macrolon® cages (type IV; 35 x 55 x 10 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) before surgery. Temperature ( $20\pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $50\pm 10\%$ ) were kept constant in the animal house and a 12:12-h light-dark schedule with lights on at 6.00 h was maintained. Rats were given *ad libitum* access to water. Food (standard maintenance chow, Altromin, Lage, Germany) was restricted to 15 g per day and animal.

### Experimental design

*Experiment I:* Systemic administration of clozapine and haloperidol. Each rat received an intraperitoneal injection of 1 mg/kg haloperidol (N=5) or 20 mg/kg clozapine (N=5), rats receiving saline injections (N=4) with an appropriate volume served as controls. Timing of all injections was locked to the beginning of the microdialysis sampling period (30 min each).

*Experiment II:* Reverse microdialysis of clozapine and raclopride. Each rat was perfused with increasing concentrations (1, 10, 100 and 1000  $\mu\text{M}$ ) of clozapine (N=5) or raclopride (N=5) for 60 min each, followed by perfusion of artificial cerebrospinal fluid alone (without drug) for 150 min.

*Stereotaxic surgery.* Animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) following pretreatment with atropine sulphate (0.5 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and secured in a Kopf stereotaxic

apparatus (Kopf Instruments, Tujunga, USA). For experiment I, animals weighing 230-360g were implanted unilaterally with intracranial guide cannulae (MAB 6.14.IC, Microbiotech/se, Stockholm, Sweden) aiming to the GP at the following coordinates (Paxinos and Watson 1986): AP -1,1 mm L 2,5 mm and V -4,5 mm (from dura). For experiment II, animals weighing 240-370 g were implanted with intracranial guide cannulae (CMA/12, CMA, Solna, Sweden) at the same coordinates as above. After the surgery rats were housed individually in Macrolon® cages (type III; 37 x 21 x 30 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) with raised solid-walled lids. Each rat was given at least one week to recover from surgery.

### **Microdialysis setup**

The microdialysis experiment was performed in the home cage of the animal with the lid replaced by a metal frame bearing a counterbalanced arm with the swivel assembly. Dual channel liquid swivels, either Tsumura TCS2-23 (Pronexus, Skärholmen, Sweden) or Instech low torque swivels (375/D22/QM, Instech Labs., Plymouth Meeting, USA) were used. Attachment to the swivel was achieved by a spring tether connected directly to the head mount via a self-made plug.

A microdialysis probe either MAB 6.14.2 (Microbiotech/se, Stockholm, Sweden, experiment I) or CMA/12 (CMA, Solna, Sweden, experiment II) with an exposed membrane length of 2 mm was inserted through the guide cannula at least 7 h before sampling of the first baseline value and perfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (145 mM Na<sup>+</sup>, 2.5 mM K<sup>+</sup>, 2.4 mM Ca<sup>2+</sup> [experiment I] or 1.2 mM Ca<sup>2+</sup> [experiment II] and 0.9 mM Mg<sup>2+</sup>) delivered by a CMA/100 microdialysis pump (CMA, Solna, Sweden) at 2.0 µl/min. ACSF for experiment I contained 3 µM nomifensine, a catecholamine reuptake inhibitor. Samples were collected every 30 min.

### *Drugs*

For systemic administration (experiment I) sterile saline (Fresenius, Bad Homburg, Germany), haloperidol (Haldol-Janssen, Janssen, Neuss, Germany), and clozapine (Tocris, Ellisville, USA) were used. Clozapine was diluted with 0.1 M HCl to a final concentration of 10 mg/ml and aliquots were stored frozen (-70 °C). A stock solution of nomifensine maleate (RBI, Natick, USA) at a concentration of 887 µM was prepared in ultra pure water, stored in frozen (-70 °C) aliquots and added to the aCSF in a final concentration of 3 µM in experiment I.

For reverse microdialysis (experiment II), a stock solution of clozapine (Tocris, Ellisville, USA) was prepared in 0.1 M HCl (50 mM) and aliquots were stored frozen. At the experimental day, stocks were diluted with aCSF to a concentration of 1 mM and pH was adjusted to 6-7 with NaOH. Thereafter, stocks were diluted with aCSF to the final concentration of 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M and 1  $\mu$ M were prepared. Stock solutions with raclopride (s(-)-raclopride tartrate, Sigma Deisenhofen, Germany) were prepared in aCSF (10 mM) and aliquots were stored frozen (-70 °C). At the experimental day, aliquots were further diluted with aCSF to 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M and 1  $\mu$ M.

### *Analytical Procedure*

Dialysates were analyzed for DA, DOPAC and HVA using HPLC with electrochemical detection. The mobile phase used in experiment I consisted of 2 g/l sodium-acetate, 5 g/l citric acid, 200-600 mg/l 1-heptanesulfonic acid, 110 mg/l Na<sub>2</sub>-EDTA and 12.5 % (v/v) methanol with pH at 3.9 before methanol addition. For experiment II sample run time was shortened by increasing the methanol concentration of the mobile phase to 18.5 % (v/v). Retention of DA was increased by elevating the HSA concentration to 2000 mg/l to elute DA subsequent to metabolites. Minor modifications in the concentrations of HSA and methanol were made to optimize DA peak separation if necessary. The HPLC apparatus consisted of a Flux Rheos 2000 pump (Flux Instruments, Basel, Switzerland), a cooled CMA/200 autosampler (CMA, Solna, Sweden), a Nucleosil C<sub>18</sub> column (Bischoff, Leonberg, Germany; 5  $\mu$ m particles, length x i.d. 125 x 3 mm) and a dual electrode BAS LC4C amperometric detector (Bioanalytical Systems, Lafayette, USA) with the electrode potential set to 600 mV at high gain to quantify DA and 700 mV at a lower gain to measure the metabolites. Filter setting was 0.1 Hz. The separation was performed at room temperature and sample run time was less than 7 min. The detection limit of DA in a standard solution was routinely about 2 pg per injection or lower.

### *Reconstruction of probe location*

After the experiments, animals were killed, the brains removed, fixed for at least 2 h in formalin and immersed in 30 % (w/v) sucrose for several days. Cryosections (60  $\mu$ m) were taken and stained with cresyl violet. Only data from animals with correct probe location, i.e. most of the exposed dialysis membrane located within the GP, were evaluated.

### *Data expression and statistics*

Data are expressed as mean percentages of control values ( $\pm$  standard error of the mean, SEM). The average concentration of the three samples before drug administration (not corrected for probe recovery) was taken as control and set to 100 %. Data data were analyzed by a nonparametric one-way ANOVA for repeated measurements followed by Dunnett's multiple comparisons test where appropriate. The last baseline sample was taken as reference. An alpha level of  $p < 0.05$  was regarded to represent statistical significance.

## **Results**

### *Basal dialysate DA levels*

In experiment I, basal dialysate DA concentrations were  $27.7 \pm 4.4$  pg/60  $\mu$ l (saline-treated animals),  $16.0 \pm 5.3$  pg/60  $\mu$ l (clozapine-treated animals) and  $36.8 \pm 3.8$  pg/60  $\mu$ l (raclopride-treated animals). In experiment II, basal dialysate DA concentrations were  $8.5 \pm 0.7$  pg/60  $\mu$ l (clozapine-treated animals) and  $4.9 \pm 0.3$  pg/60  $\mu$ l (raclopride-treated animals) .

### *Experiment I: Systemic administration of clozapine and haloperidol*

*Effects on DA.* Administration of clozapine (20 mg/kg i.p.) produced an increase ( $F_{10,40}=3.0026$ ,  $p=0.00641$ ) of dialysate DA to about 180 % of baseline (Fig. 1). DA levels returned to baseline 3 hours after application. Administration of haloperidol (1 mg/kg i.p.) increased pallidal DA to about 160 % of baseline ( $F_{10,30}=16.405$ ,  $P < 0.00001$ )(Fig.1) and dialysate DA remained elevated during the observation period. Administration of saline (1 ml/kg i.p.) did not produce changes in dialysate DA, however a gradual increase of dialysate DA was observed resulting in significantly elevated DA levels in the last four samples of the observation period ( $F_{10,30}=10.956$ ,  $P < 0.00001$ )(Fig. 1).

*Effects on DOPAC and HVA.* Administration of clozapine or haloperidol produced increases in dialysate DOPAC ( $F_{10,40}=10.767$ ,  $P < 0.00001$  and  $F_{10,40}=7.2212$ ,  $P < 0.00001$ , respectively) and HVA ( $F_{10,40}=4.9779$ ,  $P=0.00011$  and  $F_{10,40}=3.1880$ ,  $P < 0.00428$ , respectively) levels. In saline controls no significant changes in DOPAC ( $F_{10,30}=1.3501$ ,  $p=0.25031$ ) or HVA ( $F_{10,30}=1.4389$ ,  $P=0.21144$ ) were observed (Fig. 2).

### *Experiment II: Reverse microdialysis of clozapine and raclopride*

*Effects on DA.* Raclopride and clozapine increased dialysate DA levels ( $F_{15,60}=15.60$ ,  $P=0.00004$  and  $F_{15,45}=14.12$ ,  $P < 0.00001$ , respectively) (Fig. 3). Post-hoc Dunnett's test

revealed significant increases of dialysate DA with the highest concentration of raclopride tested (1 mM).

*Effects on DOPAC and HVA.* Clozapine in all concentrations tested (1-1000  $\mu$ M) had no effect on dialysate HVA ( $F_{15,45}=1.5784$ ,  $P=0.11877$ ). Dialysate DOPAC levels were affected by cumulative raclopride or clozapine ( $F_{15,45}=2.4045$ ,  $P=0.01185$  and  $F_{15,45}=3.0464$ ,  $P=0.00195$ , respectively). Post-hoc Dunnett's test did not reveal significant differences between individual samples with drug treatment and respective control values (T=0 min). Dialysate HVA was increased significantly after reverse dialysis of raclopride at the end of the observation period ( $F_{15,60}=3.3803$ ,  $P=0.00039$ )(Fig. 4).

## Discussion

The present *in vivo* microdialysis study demonstrates that typical and atypical APD had comparable stimulating effects on extracellular DA in the GP after systemic administration and after reverse microdialysis of high concentrations into the GP.

### *APD effects after systemic administration*

In experiment I, a moderate increase of basal dialysate DA levels was observed over the 4 hours experimental period which was significant in saline-treated animals beginning at 150 min post-injection. Furthermore, basal DA levels were about 3-times higher than in experiment II. In keeping with earlier data, elevated levels of basal DA are likely to be the result of local reuptake inhibition by nomifensine (Nomikos et al. 1990). In addition, local reuptake inhibition might account for the baseline drift which has been observed in previous studies with nomifensine (Hauber and Fuchs 2000), but not without nomifensine (Fuchs et al., unpublished observation).

Systemic administration of clozapine induced a transient DA release with a peak during the initial post-infusion sample. In contrast, haloperidol produced a permanent increase of extracellular GP DA levels with an onset in the initial post-infusion sample. It is unlikely that reuptake inhibition interferes with these effects since in saline-treated animals GP DA levels were unchanged up to 150 min post-injection. The dose of clozapine used here was 20-fold higher as haloperidol, because doses of clozapine at least 10 times higher as haloperidol were considered to be equipotent and generally used to compare neurochemical effects of both drugs (e.g. Meltzer et al. 1994; Pehek and Yamamoto 1994; Gray and Connick 1998;

Ichikawa and Meltzer 2000). Thus the present data reveal that typical and atypical APD in about equipotent doses elicited a similar DA efflux in the GP. The prolonged effects of haloperidol on GP DA levels measured here might reflect a specific dose effect comparable to that observed in the caudate-putamen: Imperato and Di Chiara (1985) revealed that haloperidol in a dose range from 0.012 – 0.5 mg/kg s.c. dose-dependently and transiently increased striatal extracellular DA to 140% -200% of baseline, except the highest dose which permanently increased DA levels for 8 h. In addition, clozapine and haloperidol elevated dialysate DOPAC and HVA in the GP. As extracellular DOPAC is assumed to be a marker for cytoplasmatic dopamine synthesis (Zetterstrom et al. 1988) our present data imply that systemic treatment with APD influences GP DA metabolism.

A large number of studies show that haloperidol is most effective in increasing DA in the caudate-putamen, whereas clozapine is much less effective to do so (Pehek and Yamamoto 1994; Volonte et al. 1997; Westerink et al. 2001). However a few studies were not able to detect a clear-cut dissociation of the effects of clozapine and haloperidol on striatal DA (Moghaddam and Bunney 1990; Gray and Connick 1998). The likely mechanism underlying the increase of extracellular DA is a feedback response triggered by a D2 receptor blockade (Westerink et al. 2001). Moreover, numerous studies revealed that typical APD produce much higher expression of immediate early genes, e.g. c-fos, in the caudate-putamen, as atypical APD (Nguyen et al. 1992; Robertson and Fibiger 1992; Bubser and Deutch 2002). It is hypothesized that the high liability of typical APD for extrapyramidal motor side effects might be related to their prominent actions on D2 receptors in the caudate-putamen (Nordstrom et al. 1993). By analogy, we expected differential actions of haloperidol and clozapine on GP DA, however, our data provide no evidence in support of this notion. Thus, we conclude that effects on GP DA do not account for the differential motor side effects liability of typical and atypical APD. This does not argue against the GP as a possible site of such effects as systemic administration and intra-GP infusion of clozapine decreased pallidal GABA, an effect which might be related to its low side effect liability (Chapman and See 1996; See and Berglind 2001, but see Drew et al. 1990).

#### *APD effects after reverse microdialysis into the GP*

Due to its superior solubility in aCSF with neutral pH we used the selective D2 antagonist raclopride instead of haloperidol as typical APD for reverse microdialysis. Both drugs have been shown to bind *in vivo* almost exclusively to D2 receptors (Hall et al. 1989). A cumulative dosing regimen with maximum concentrations of 1 mM for raclopride and

clozapine was applied. Results revealed that clozapine and raclopride both failed to induce a significant DA release in the GP at concentrations up to 100  $\mu$ M. At concentration of 1 mM, clozapine produced a pronounced DA release in the GP, while raclopride had moderate, albeit significant stimulating effects on GP DA.

The fact that intra-GP administration of the highly selective D2 receptor antagonist and typical APD raclopride (Seeman and Van Tol 1994) did affect extracellular DA only in a very high concentration suggests that intra-GP D2 receptor blockade did not account for the increase of GP DA observed after systemic administration of haloperidol. Rather, this effect might be exerted by effects on D2 receptors located on midbrain DA cell bodies. Another implication of the failure of intra-GP raclopride to enhance extracellular DA is that the GP might lack presynaptic D2 autoreceptors. Blockade of these receptors localized on nerve terminals e.g. in the striatum is known to stimulate DA efflux (Westerink et al. 2001). In the GP D2 receptors are probably located presynaptically on striatopallidal terminals (Mansour et al. 1990; Weiner et al. 1991) and control GABA release (Cooper and Stanford 2001). However, there is no evidence for the existence of presynaptically located D2 autoreceptors on nigropallidal fibres. Thus D2 autoreceptors might not be involved in regulation of extracellular GP DA as demonstrated in the prefrontal cortex (Bannon et al. 1983; Chiodo et al. 1984; Cubeddu et al. 1990). Alternatively, the DA tone acting on D2 autoreceptors might be very low under basal conditions, because the GP receives a “sparse” DA innervation (Arluison et al. 1984). Accordingly, intra-GP D2 receptor blockade did not decrease GP GABA levels (See and Berglind 2001) though the presence of presynaptic D2 receptors on striatopallidal terminals. The moderate increase of GP DA after perfusion of raclopride might be due to unspecific effects of the very high concentration (1 mM) used. Taken together, our data point to the view that the DA release in the GP is not regulated by presynaptic D2 autoreceptors under basal conditions as there was no dose-dependent increase of extracellular DA after an intra-GP D2 receptor blockade. The GP bears D3 receptors (Larson and Ariano 1995; Gurevich and Joyce 1999) which display an unusually high affinity to dopamine (Levesque et al. 1992) and have been implicated in presynaptic regulation of DA release and synthesis (Sotnikova et al. 2001). Thus, D3 receptors might play a role in regulation of extracellular GP DA, however, anatomical data on the ultrastructural localization of pallidal D3 receptors are not available.

Clozapine failed to stimulate DA efflux in the GP except with the highest concentration. Thus intra-GP actions are unlikely to account for the increase of GP DA observed after systemic administration of clozapine. Clozapine displays high affinities to multiple receptors, including



5HT<sub>2A</sub> receptors, D<sub>1</sub> receptors, D<sub>4</sub> receptors muscarinergic receptors and alpha-adrenoceptors (Coward 1992). From the present data it is not possible to delineate which of these receptor mechanisms might mediate the massive increase of GP DA induced by the highest concentration of clozapine.

Recent data show that reverse microdialysis of 100  $\mu$ M clozapine reduced GP GABA levels (See and Berglind 2001). Although we found no effects on GP DA with 100  $\mu$ M clozapine, it is conceivable that 1 mM clozapine tested in our experiment might produce an even more pronounced decrease of pallidal GABA, which in turn might stimulate GP DA efflux due to disinhibition. This notion is supported by data showing that reverse microdialysis of picrotoxin, a GABA receptor antagonist, into the GP increased DA (Fuchs and Hauber, unpublished observations). Furthermore reverse microdialysis of picrotoxin into the ventral pallidum enhanced extracellular DA (Gong et al. 1998) suggesting that GABA receptors might have inhibitory actions on pallidal DA release. However, the view that a high concentration of clozapine stimulated GP DA release by reduced inhibition via GABA receptors remains elusive and needs further experimental support.

Taken together, our results reveal that reverse microdialysis of raclopride, a highly selective D<sub>2</sub> receptor antagonist and typical APD did not stimulate DA efflux when administered in wide range of concentrations. This suggests that GP DA release under basal conditions is not regulated by D<sub>2</sub> autoreceptors, which may be explained (i) by a general lack of autoreceptors in the GP, or, (ii) by a dopamine tone too low to stimulate autoreceptors under basal conditions. Furthermore, our data demonstrate that systemic administration of typical and atypical APD stimulated GP DA and DA metabolism to about the same extent. Thus, contrasting with the caudate-putamen, GP DA release induced by typical and atypical APD seems not be correlated with their different extrapyramidal motor side effect liability. However, recent data suggest that other neurochemical effects of clozapine within the GP might contribute to its failure to produce significant motor side effects. Systemic and local clozapine effectively decreased GP GABA (Chapman and See 1996; See and Berglind 2001), a mechanism suggested to mitigate the development of motor side effects (See and Berglind 2001)

### **Acknowledgements**

Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ha 2340/4-2). The authors are grateful for the generous technical support of Dr. K. Drescher (Abbott, Ludwigshafen) and N. Wenkel (Axel Semrau, Sprockhövel). This publication is part of the PhD thesis of H.F.

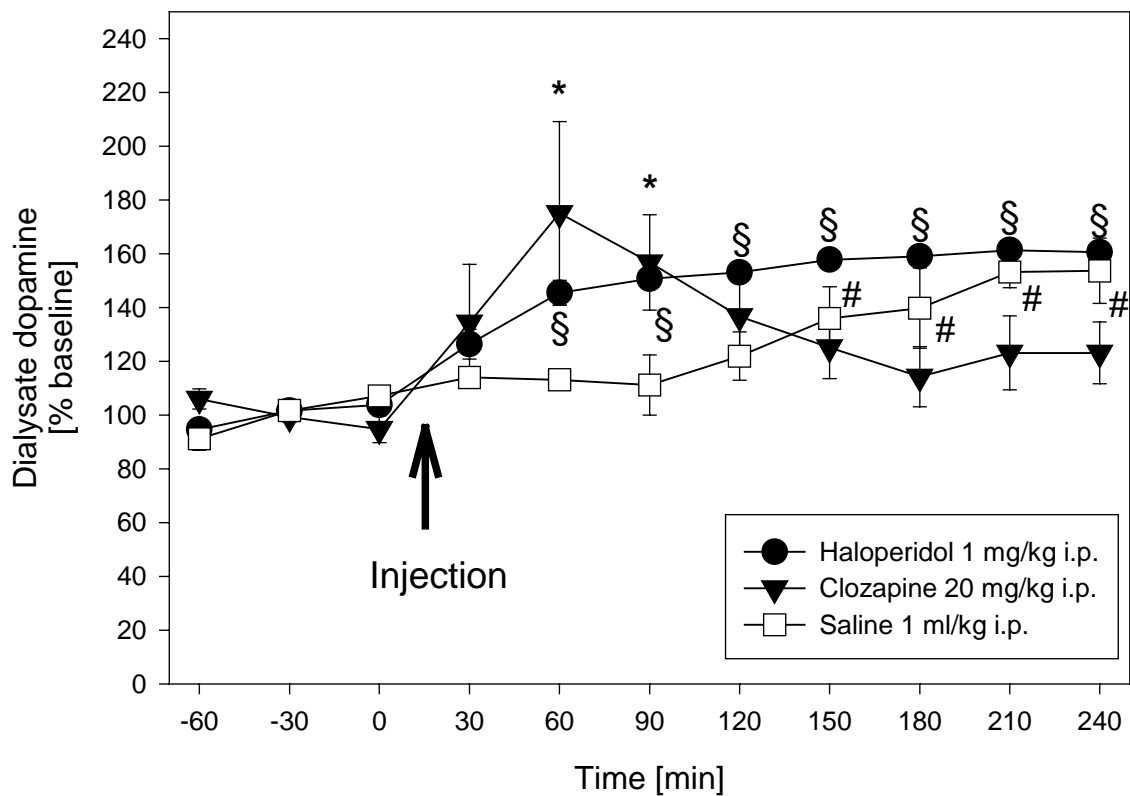


Fig. 1: Effects of systemic application of clozapine (20 mg/kg i.p.), haloperidol (1 mg/kg i.p.) or saline (1 ml/kg i.p.) on dialysate dopamine levels in the GP. Time of injection is indicated by an arrow. \*(clozapine), § (haloperidol) and # (saline) indicate significantly different values as compared to the last respective baseline sample (T=0 min)(P<0.05, ANOVA for repeated measurements followed by post-hoc Dunnett's test).

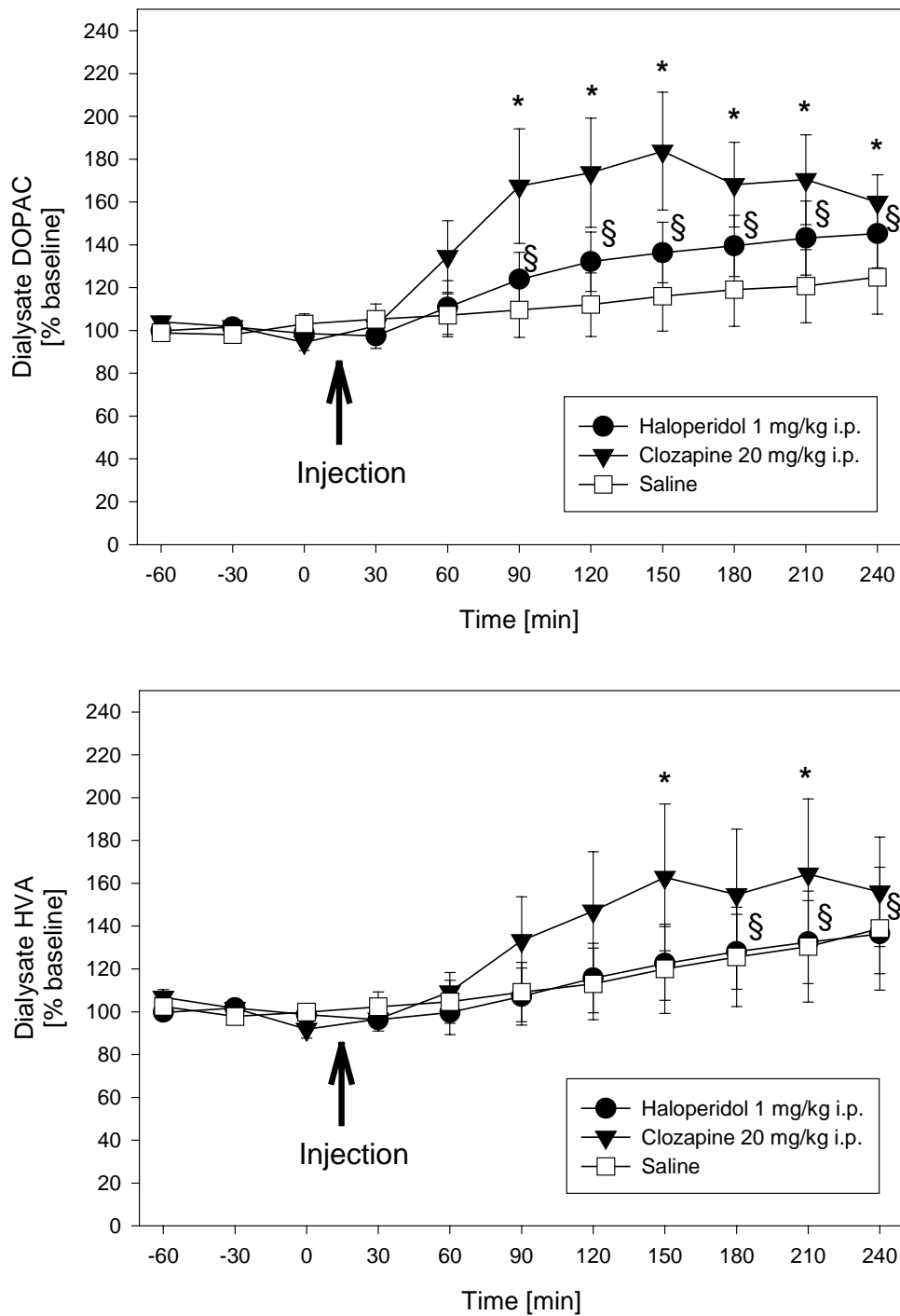


Fig. 2: Effect of systemic application of clozapine (20 mg/kg i.p.), haloperidol (1 mg/kg i.p.) or saline (1 ml/kg i.p.) on dialysate DOPAC (upper panel) and HVA (lower panel) levels obtained from the GP. Time of injection is indicated by an arrow. \*(clozapine) and § (haloperidol) indicate significantly different values as compared to the last respective baseline sample (T=0 min)(P<0.05, ANOVA for repeated measurements followed by post-hoc Dunnett's test).

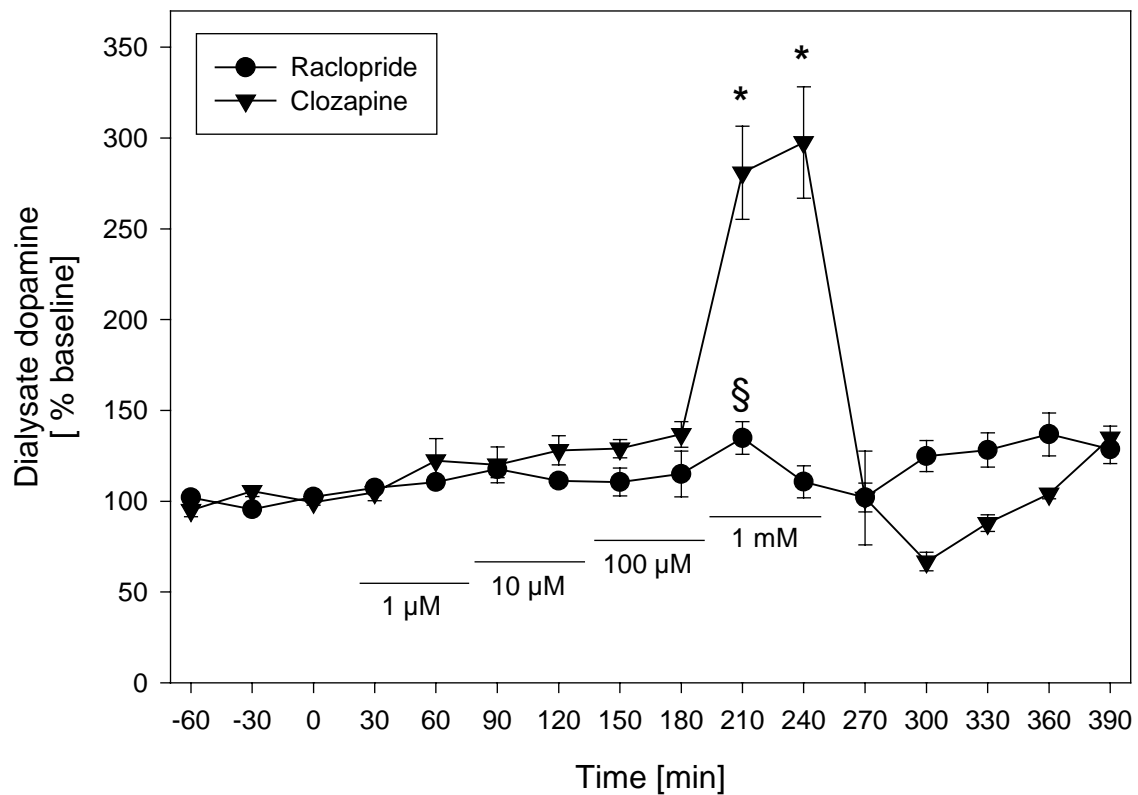


Fig. 3: Effect of local application of clozapine or raclopride in increasing concentrations from 1-1000  $\mu$ M on the dialysate dopamine levels obtained from the GP. Solid lines represent the time of application of each concentration. \*(clozapine) and § (raclopride) indicate significantly different values as compared to the last respective baseline sample (T=0 min)( $P < 0.05$ , ANOVA for repeated measurements followed by post-hoc Dunnett's test).

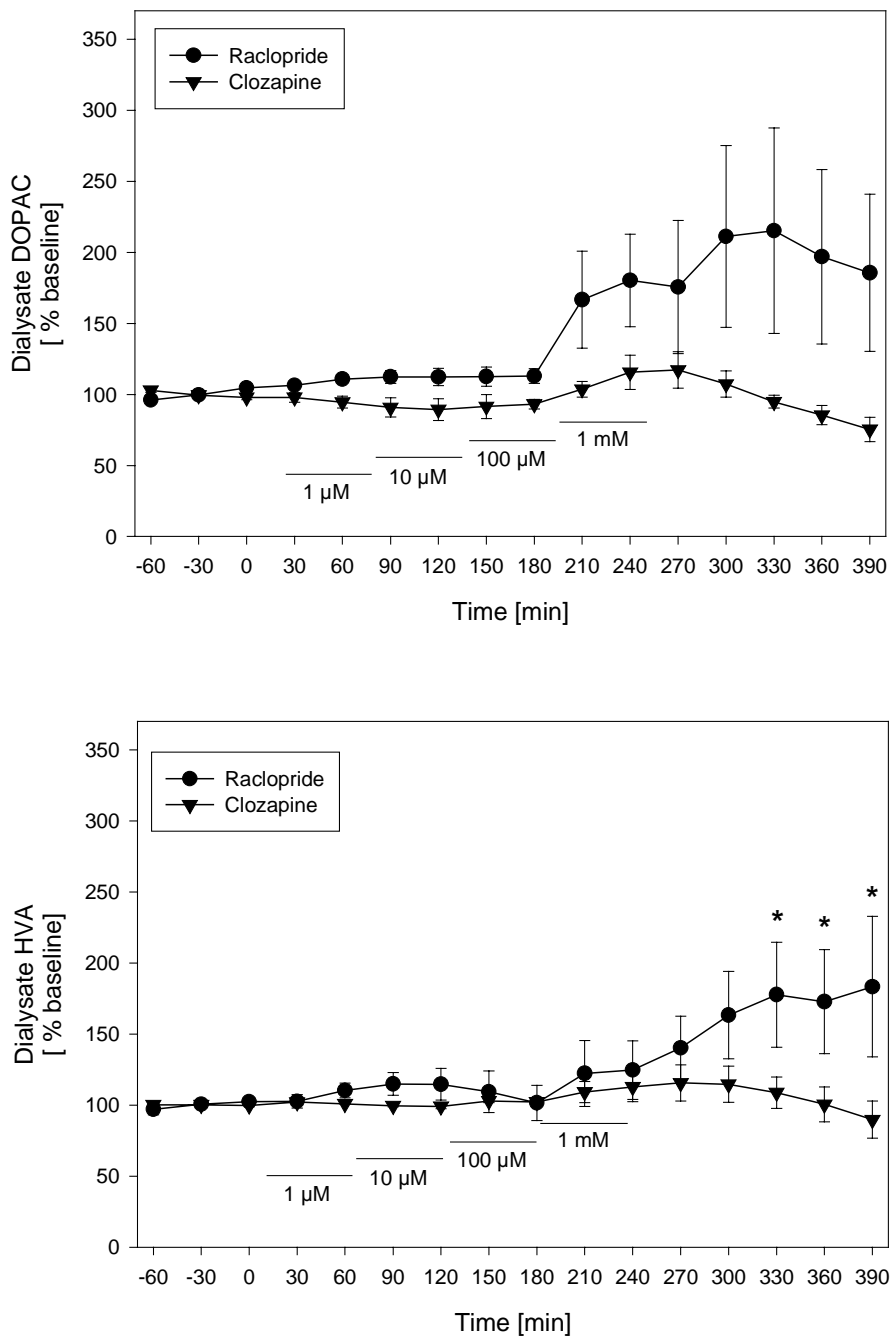


Fig. 4: Effect of local application of clozapine or raclopride in increasing concentrations from 1-1000 μM on dialysate DOPAC (upper panel) and HVA (lower panel) levels obtained from the GP. Solid lines represent the time of application of each concentration. \*(raclopride) indicate significantly different values as compared to the last respective baseline sample (T=0 min)(P<0.05, ANOVA for repeated measurements followed by post-hoc Dunnett's test).

## References

- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-75
- Arluison M, Dietl M, Thibault J (1984) Ultrastructural morphology of dopaminergic nerve terminals and synapses in the striatum of the rat using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry: a topographical study. *Brain Res Bull* 13:269-85
- Bannon MJ, Wolf ME, Roth RH (1983) Pharmacology of dopamine neurons innervating the prefrontal, cingulate and piriform cortices. *Eur J Pharmacol* 92:119-25.
- Bubser M, Deutch AY (2002) Differential effects of typical and atypical antipsychotic drugs on striosome and matrix compartments of the striatum. *Eur J Neurosci* 15:713-20.
- Chapman MA, See RE (1996) Differential effects of unique profile antipsychotic drugs on extracellular amino acids in the ventral pallidum and globus pallidus of rats. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1586-94
- Chiodo LA, Bannon MJ, Grace AA, Roth RH, Bunney BS (1984) Evidence for the absence of impulse-regulating somatodendritic and synthesis-modulating nerve terminal autoreceptors on subpopulations of mesocortical dopamine neurons. *Neuroscience* 12:1-16.
- Cooper AJ, Stanford IM (2001) Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA(A) IPSCs in vitro. *Neuropharmacology* 41:62-71.
- Costall B, Naylor RJ, Olley JE (1972) Catalepsy and circling behaviour after intracerebral injections of neuroleptic, cholinergic and anticholinergic agents into the caudate-putamen, globus pallidus and substantia nigra of rat brain. *Neuropharmacology* 11:645-63
- Coward DM (1992) General pharmacology of clozapine. *Br J Psychiatry Suppl* :5-11.
- Cubeddu LX, Hoffmann IS, Talmaciu RK (1990) Is the release of dopamine from medial prefrontal cortex modulated by presynaptic receptors? Comparison with nigrostriatal and mesolimbic terminals. *Ann N Y Acad Sci* 604:452-61
- Drew KL, O'Connor WT, Kehr J, Ungerstedt U (1990) Regional specific effects of clozapine and haloperidol on GABA and dopamine release in rat basal ganglia. *Eur J Pharmacol* 187:385-97
- Fallon JH, Moore RY (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180:545-80
- Fuchs H, Hauber W (2002) Dopaminergic Innervation of the Rat Globus Pallidus Characterized by In Vivo Microdialysis and Immunohistochemistry. ins submission
- Gong W, Neill DB, Justice JB, Jr. (1998) GABAergic modulation of ventral pallidal dopamine release studied by in vivo microdialysis in the freely moving rat. *Synapse* 29:406-12
- Gray AM, Connick JH (1998) Clozapine-induced dopamine levels in the rat striatum and nucleus accumbens are not affected by muscarinic antagonism. *Eur J Pharmacol* 362:127-36
- Gurevich EV, Joyce JN (1999) Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons. *Neuropsychopharmacology* 20:60-80.
- Hall H, Ogren SO, Kohler C, Magnusson O (1989) Animal pharmacology of raclopride, a selective dopamine D2 antagonist. *Psychopharmacol Ser* 7:123-30
- Hauber W, Lutz S (1999) Dopamine D1 or D2 receptor blockade in the globus pallidus produces akinesia in the rat. *Behav Brain Res* 106:143-50

- Hauber W, Fuchs H (2000) Dopamine release in the rat globus pallidus characterised by in vivo microdialysis. *Behav Brain Res* 111:39-44
- Ichikawa J, Meltzer HY (2000) The effect of serotonin(1A) receptor agonism on antipsychotic drug-induced dopamine release in rat striatum and nucleus accumbens. *Brain Res* 858:252-63
- Imperato A, Di Chiara G (1985) Dopamine release and metabolism in awake rats after systemic neuroleptics as studied by trans-striatal dialysis. *J Neurosci* 5:297-306
- Larson ER, Ariano MA (1995) D3 and D2 dopamine receptors: visualization of cellular expression patterns in motor and limbic structures. *Synapse* 20:325-37
- Levesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P (1992) Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8155-9.
- Lindvall O, Björklund A (1979) Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 172:169-73
- Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson SJ (1990) Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization- receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci* 10:2587-600
- Marshall JF, Henry BL, Billings LM, Hoover BR (2001) The role of the globus pallidus D2 subfamily of dopamine receptors in pallidal immediate early gene expression. *Neuroscience* 105:365-78
- Meltzer HY, Chai BL, Thompson PA, Yamamoto BK (1994) Effect of scopolamine on the efflux of dopamine and its metabolites after clozapine, haloperidol or thioridazine. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1452-61.
- Meltzer HY, Park S, Kessler R (1999) Cognition, schizophrenia, and the atypical antipsychotic drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13591-3
- Moghaddam B, Bunney BS (1990) Acute effects of typical and atypical antipsychotic drugs on the release of dopamine from prefrontal cortex, nucleus accumbens, and striatum of the rat: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 54:1755-60
- Nguyen TV, Kosofsky BE, Birnbaum R, Cohen BM, Hyman SE (1992) Differential expression of c-fos and zif268 in rat striatum after haloperidol, clozapine, and amphetamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4270-4.
- Nomikos GG, Damsma G, Wenkstern D, Fibiger HC (1990) In vivo characterization of locally applied dopamine uptake inhibitors by striatal microdialysis. *Synapse* 6:106-12
- Nordstrom AL, Farde L, Wiesel FA, Forslund K, Pauli S, Halldin C, Uppfeldt G (1993) Central D2-dopamine receptor occupancy in relation to antipsychotic drug effects: a double-blind PET study of schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 33:227-35.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, New York: Academic Press.
- Pehek EA, Yamamoto BK (1994) Differential effects of locally administered clozapine and haloperidol on dopamine efflux in the rat prefrontal cortex and caudate-putamen. *J Neurochem* 63:2118-24.
- Robertson GS, Fibiger HC (1992) Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience* 46:315-28
- Ruskin DN, Marshall JF (1997) Differing influences of dopamine agonists and antagonists on Fos expression in identified populations of globus pallidus neurons. *Neuroscience* 81:79-92.
- See RE, Berglind WJ (2001) Decreased pallidal GABA following reverse microdialysis with clozapine, but not haloperidol. *Neuroreport* 12:3655-8.

- Seeman P, Van Tol HH (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 15:264-70
- Seeman P (2001) Antipsychotic drugs, dopamine receptors, and schizophrenia. *Clinical Neuroscience Research* 1:53-60
- Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Grekhova TV, Rayevsky KS (2001) Effects of intrastriatal infusion of D2 and D3 dopamine receptor preferring antagonists on dopamine release in rat dorsal striatum. *Pharmacol Res* 43:283-90.
- Volonte M, Monferini E, Cerutti M, Fodritto F, Borsini F (1997) BIMG 80, a novel potential antipsychotic drug: evidence for multireceptor actions and preferential release of dopamine in prefrontal cortex. *J Neurochem* 69:182-90.
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1859-63
- Westerink BH, Kawahara Y, De Boer P, Geels C, De Vries JB, Wikstrom HV, Van Kalkeren A, Van Vliet B, Kruse CG, Long SK (2001) Antipsychotic drugs classified by their effects on the release of dopamine and noradrenaline in the prefrontal cortex and striatum. *Eur J Pharmacol* 412:127-38.
- Zetterstrom T, Sharp T, Collin AK, Ungerstedt U (1988) In vivo measurement of extracellular dopamine and DOPAC in rat striatum after various dopamine-releasing drugs; implications for the origin of extracellular DOPAC. *Eur J Pharmacol* 148:327-34



## 5.5. Methodische Anmerkungen

Da neben den mit Hilfe der Mikrodialyse und HPLC-Analytik erzielten Ergebnissen auch die weitere Verbesserung dieser Techniken ein nicht unwesentlicher Aspekt der durchgeführten Arbeit darstellte, sollen die wichtigsten praktischen Erfahrungen hier dokumentiert werden. Soweit Einschätzungen über Zuverlässigkeit und Leistungsfähigkeit kommerzieller Produkte dargelegt werden, ist dies die persönliche Meinung des Autors entsprechend seiner subjektiven Erfahrungen während der Durchführung dieser Arbeit.

### Vorbemerkung

Die Mikrodialyse mit nachgeschalteter HPLC-Analytik ist in ihrem praktischen Einsatz eine sehr anfällige Technik. Ergebnisse eines Einzelversuches sind nur dann verwertbar, wenn vom Einsetzen der Sonde bis zur Messung der Dialysate über den gesamten Versuchszeitraum keine nennenswerten Störungen auftreten. Schon bei kleineren Unregelmäßigkeiten kann der gesamte Versuch gefährdet sein. Nachfolgend werden die häufigsten Ursachen für ein Misslingen aufgeführt:

- beschädigte Dialysemembran
- verstopfte Verschlauchung
- defekter *Swivel*
- plötzlicher Abfall der Basalwerte bei ansonsten unauffälliger Dialyse und Analytik
- analytische Probleme wie unzureichende Trennung und unregelmäßiger Chromatogramm-Basislinie (*baseline*)

### 5.5.1. Mikrodialyse

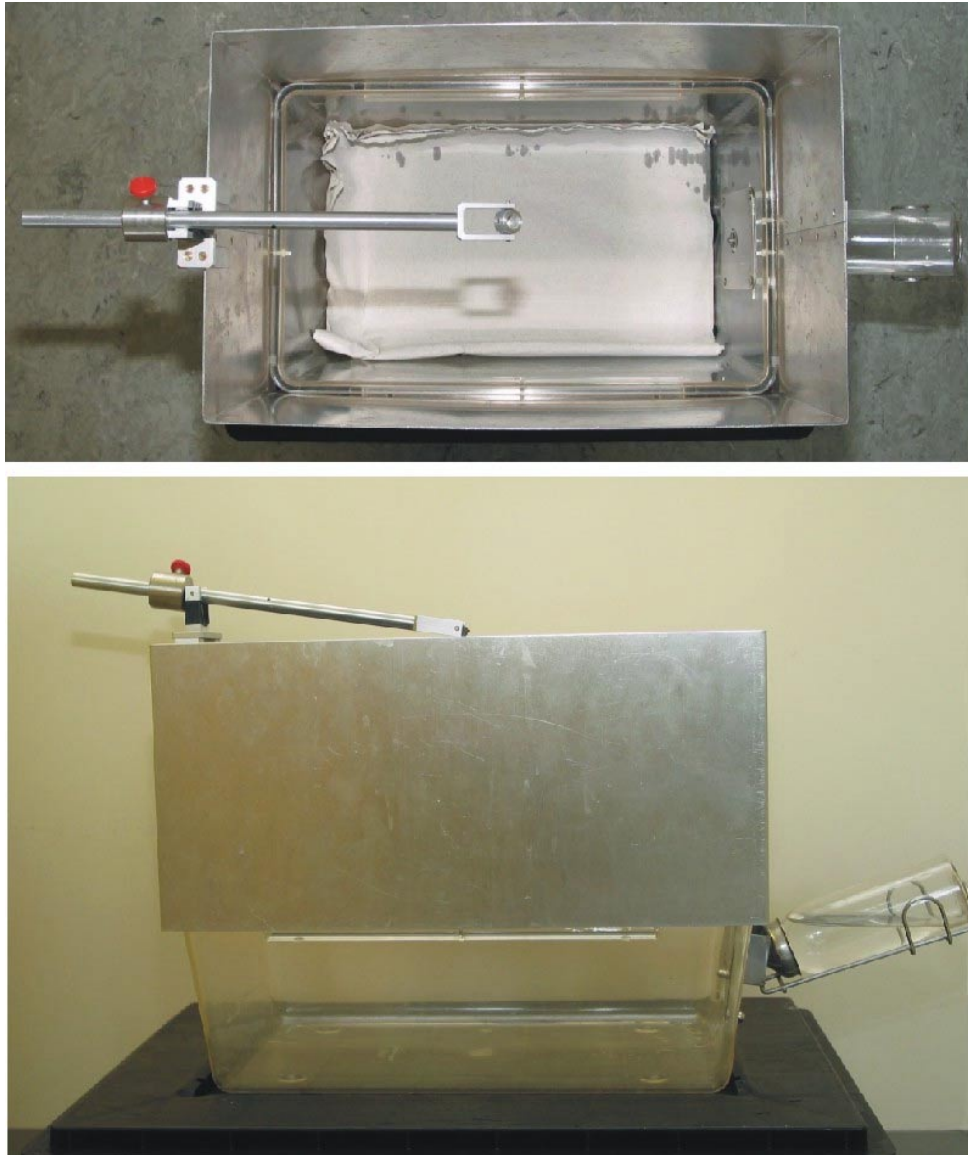
#### Käfige

Von entscheidendem Vorteil erwies sich die Modifizierung der Dialysevorrichtung, so dass der Haltungskäfig des Tieres auch während des Versuches genutzt wurde. Dazu wurde nur der Deckel durch einen selbst angefertigten Metallrahmen<sup>6</sup> (Gesamthöhe vom Käfigboden aus gemessen 33 cm) ersetzt, an dem dann der ausbalancierte Arm mit *Swivel* (Drehgelenk für Flüssigkeiten, Abb. 9), Verschlauchung und *Tether* („Halte- bzw. Befestigungsvorrichtung“, Abb. 8) angebracht war.

---

<sup>6</sup> Angefertigt von den Werkstätten der Physikalischen Institute der Universität Stuttgart

Dadurch war das Tier in einer olfaktorisch bekannten Umgebung. Die Versorgung mit Wasser war durch die im Käfigunterteil integrierte Trinkflasche gewährleistet. Wichtig ist das Auflegen eines Deckels, da einige Tiere in der Lage sind, die obere Kante des Metallrahmens zu überwinden.



**Abb. 7:** Mikrodialysekäfig mit Käfigaufsatz und daran montiertem ausbalancierten Arm. Ansicht von oben (oberes Bild) und Seitenansicht (unteres Bild).

### Schädelaufbauten und *Tether*

Anders als in kommerziellen Systemen wurde der *Tether* direkt am Kopfaufbau angebracht (Abb. 8). Dazu wurde der weibliche Luer Konus einer Einmalkanüle in den aus Paladur<sup>®</sup> (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts.) modellierten Aufbau integriert. Das Gegenstück

bildete ein männlicher Luer Konus, der aus dem abgetrennten Teil einer 1 ml Einmalspritze hergestellt an der Spitze des *Tethers* befestigt wurde (Abb. 8). Nach Herstellen der Verbindung durch einfaches Zusammenstecken wurde zur zusätzlichen Sicherung ein Splint aus Kupferdraht in die dafür vorgesehene Bohrungen durch beide Luer Verschlüsse gesteckt und um den *Tether* gebogen. Der *Tether* selbst bestand aus einer Spiralstahlfeder (Eisenwarenhandel), die am anderen Ende durch die Befestigungsklemmen der *Swivel* gehalten wurde. Auf halber Höhe wurde die Verschlauchung mit einem Stück Malerkrepp am *Tether* befestigt, um ein Verheddern zu verhindern (stärker klebende Bänder sind ungeeignet, da diese ein schnelles Eingreifen während des Versuchs nicht ermöglichen und die Verschlauchung beschädigt werden kann).

Der Kopfaufbau wurde in dieser Weise von den Tieren wesentlich besser toleriert, als Systeme mit Halsbändern (z.B. von CMA, Solna, Schweden) oder Brustkorbgeschirren (z.B. Infusion Harness<sup>®</sup>, Instech Labs., Plymouth Meeting, USA), die beide getestet wurden. Das Befestigen des *Tethers* erfolgt mit Hilfe des Luer Systems schnell und ohne Verschraubungen. Außerdem sind die eingebetteten Luer Konen Einmalartikel und müssen nicht zur Wiederverwertung aus dem Aufbau gelöst werden (Paladur kann durch Einlegen in Aceton aufgelöst werden und so können in den Kopfaufbauten befindliche Schrauben wiedergewonnen werden, was nicht für die Führungskanülen gilt, da diese durch Aceton angegriffen werden).



**Abb. 8:** Schädelaufbauten. Die beiden linken Bilder zeigen die Schädelaufbauten am Kopf einer Ratte mit Sonde und am Aufbau befestigtem *Tether* (oben) und ohne Sonde und *Tether* (unten). Auf der rechten Seite ist ein isolierter Kopfaufbau abgebildet. Im obere Bild zu erkennen, ist die unten herausragende Führungskanüle mit darin befindlichem *Dummy*, sowie Verankerungsschrauben, die normalerweise in den Schädleknochen eingedreht sind. Das untere Bild zeigt die Befestigung zwischen *Tether* und Aufbau mittels Luer Konen.

### Swivel

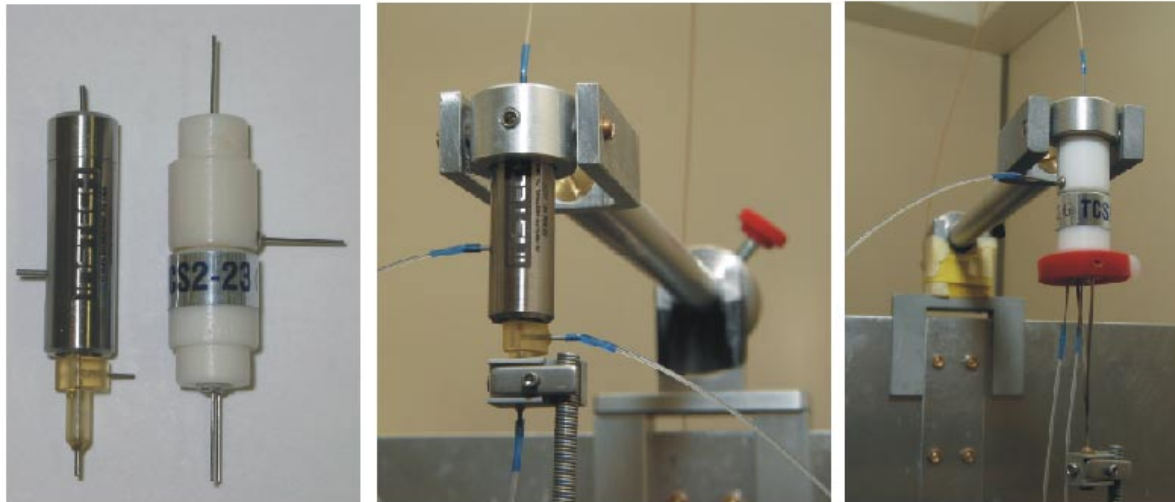
Der *Swivel*, ein Drehgelenk für Flüssigkeiten (Abb. 9), ist neben der Sonde das empfindlichste Bauteil der Mikrodialyse-Apparatur. Bedingt durch die minimalen Totvolumina der beiden Kanäle und daraus resultierenden kleinen Innendurchmesser ist er besonders anfällig gegenüber Verstopfungen. Dies kann entweder durch Partikel im Perfusat oder durch Kristallisation der im Perfusat gelösten Salze ausgelöst werden. Daher ist das Filtrieren des Perfusates (0,2 µm Membranfilter, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) und die Spülung des *Swivels* mit demineralisiertem Wasser nach Versuchsende sehr wichtig. Dies kann bei Austausch des Perfusates gegen demineralisiertes Wasser über die Mikrodialysepumpen, am besten über Nacht bei einem Fluss von 1-2 µl/min, erfolgen.

Des Weiteren reagieren *Swivel* sehr empfindlich auf Überdruck, der z.B. durch eine verstopfte Sonde aufgebaut werden kann und oft zu spät bemerkt wird. Die Dichtungen lassen dann Perfusat in den *Swivel*-Körper dringen, wo die darin gelösten Salze auskristallisieren und so die Drehbarkeit erschwert wird. Eine derartige Undichtigkeit kann nicht mehr behoben werden und der *Swivel* ist in der Regel danach unbrauchbar, da die Gefahr eines „Kurzschlusses“ besteht (Perfusat dringt direkt in den zweiten Kanal, ohne vorher durch die Sonde zu fließen).

Es wurden zwei *Swivel*-Typen eingesetzt: kostengünstige Teflon<sup>®</sup>-*Swivel* der Firma Tsumura (TCS2-23, vertrieben durch Pronexus, Skärholmen, Schweden) und teurere *Swivel* der Firma Instech (375/D22/QM, Instech Labs., Plymouth Meeting, USA), die speziell für den Einsatz bei Mäusen entwickelt wurden und dementsprechend mit kleinem Kraftaufwand zu drehen sind. Beide *Swivel* verfügen über hinreichend kleine Totvolumina der Kanäle und bringen dem Kopfaufbau keinen zu großen Widerstand entgegen, so dass dieser gelockert würde.

In der Praxis haben sich die Instech-*Swivel* als langlebiger erwiesen, was von den Tsumura *Swivel* durch ihre wesentlich geringeren Anschaffungskosten in Punkto Ökonomie zum Teil kompensiert wird.

Vergleicht man die Anfälligkeit und Kosten des Instech-*Swivels* für Mäuse (Typ 375/D22/QM) mit dem Vorgängermodell (Typ 375/D22/QE), so liegen die Kosten nur unerheblich darüber, die Anfälligkeit ist nur geringfügig höher und das Totvolumen des äußeren Kanals ist wesentlich geringer. Daher überwiegen die Vorteile des erstgenannten Typs (375/D22/QM).



**Abb. 9:** *Swivel*. Dargestellt sind die eingesetzten *Swivel*-Typen Instech 375/D22/QM und Tsumura TCS2-23 (linkes Bild), sowie ein Instech-*Swivel* (mittleres Bild) und ein Tsumura-*Swivel* (rechtes Bild) mit Verschlauchung und *Tether* (Spiralfeder) montiert im ausbalancierten Arm.

### Sonden und Führungskanülen

Praktische Erfahrungen liegen ausschließlich mit kommerziell erhältlichen Sonden vor, die in Kombination mit Führungskanülen eingesetzt wurden. Somit ist ein Vergleich mit Eigenbausonden nicht möglich.

Eingesetzt wurden Sonden vom Typ CMA\12 (vertrieben durch Axel Semrau, Sprockhövel, Deutschland) und MAB 6.14.2 (entweder Direktvertrieb durch Microbiotech/se, Stockholm, Schweden, oder innerhalb Deutschland durch TSE, Bad Homburg, Deutschland).

Die Implantation der entsprechenden Führungskanülen (MAB 6.14.IC oder *guide cannula* CMA\12) ist in beiden Fällen unproblematisch, wobei die MAB Führungskanülen exakter in den Stereotakten mit Hilfe des Sonden Clips (von CMA) einzuspannen sind. Dies wird durch einen konzentrisch im *Dummy*<sup>7</sup> integrierten Stahlstift, der am oberen Ende herausragt, erreicht (Abb. 10 und Abb. 8).

Die Sonden unterscheiden sich in ihrer *in vitro Recovery*, also dem Verhältnis der Konzentration eines Stoffes im externen Medium und im Dialysat für Dopamin und Metabolite nicht wesentlich. Bei einem Fluss von 2,0  $\mu\text{l}/\text{min}$  liegt diese für neue Sonden bei 12-16 %.

---

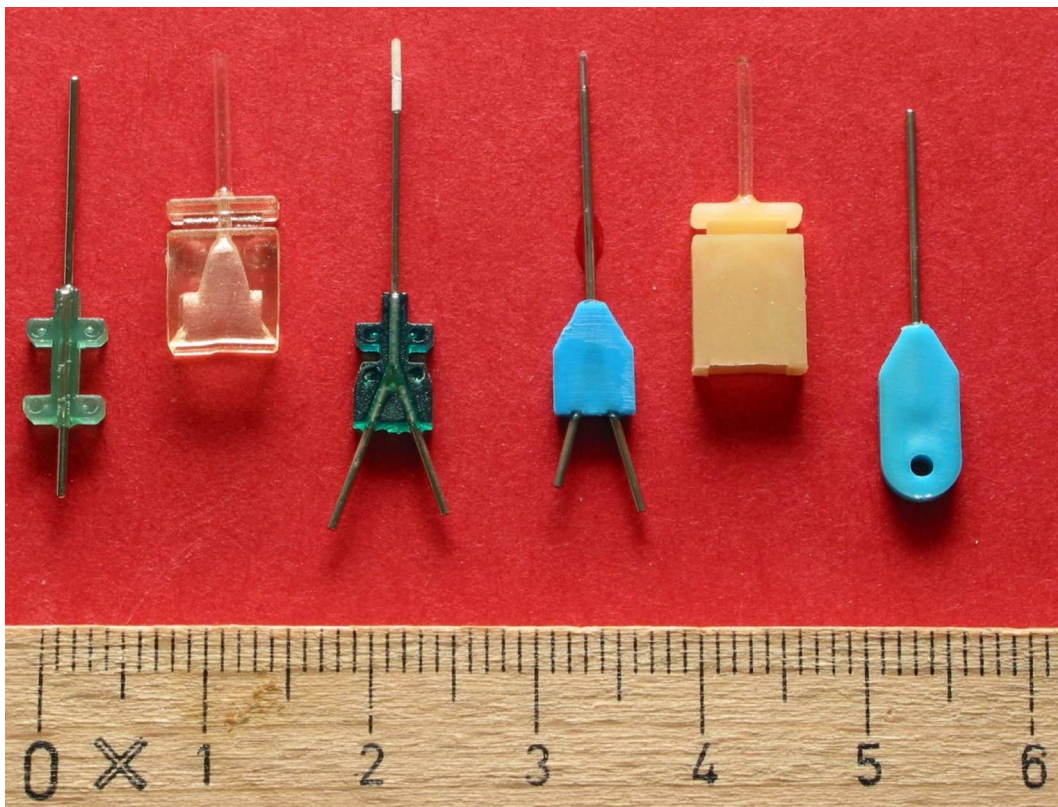
<sup>7</sup> Platzhalter, der die Führungskanüle in beiden Typen bis zum Einsetzen der eigentlichen Sonde verschließt



Ein wesentlicher Vorteil bei den MAB-Sonden ist die Lagerfähigkeit in trockenem Zustand, so dass eine gebrauchte Sonde nach Spülen mit demineralisiertem Wasser ohne weitere Vorkehrungen trocken gelagert werden kann. Bei CMA-Sonden ist dies nicht möglich. Eine einmal in Gebrauch befindliche Sonde muss ununterbrochen in Flüssigkeit gelagert werden, was auch die Gefahr der bakteriellen Kontamination mit sich bringt, was wiederum eine Ursache für die Degradation der im Dialysat gelösten Stoffe sein kann.

Ein wesentlicher Nachteil der MAB Sonde ist ihre deutlich stärkere Empfindlichkeit gegen Berührung. Dies führt zu einer höheren Anzahl der Beschädigungen der Membran beim Einsetzen in die Führungskanüle und bei der Entnahme nach Beendigung des Versuches. Auch hier wird der Nachteil teilweise durch die etwa bei der Hälfte liegenden Kosten kompensiert.

Zusammenfassend überwiegen die Vorteile des CMA-Systems vor allem durch eine höhere Zuverlässigkeit und Robustheit gegen mechanische Beanspruchung, auch wenn Fluktuationen in der Qualität verschiedener Chargen zu beobachten waren.



**Abb. 10:** Mikrodialyse-Sonden-Systeme: v.l.n.r. MAB-Dummy, -Führungskanüle, -Sonde, CMA-Sonde, -Führungskanüle. Dummy. Skala (unten) in cm.

**Tab. 3:** Gegenüberstellung der Eigenschaften von Mikrodialysesonden vom Typ CMA und MAB.

Kriterium	CMA\12 (2 mm Membran)	MAB 6.14.2
<i>in vitro Recovery</i>	keine wesentlichen Unterschiede	
Lagerung	in Flüssigkeit	<b><i>auch trocken</i></b>
Mechanische Belastbarkeit	<b><i>robuster</i></b>	anfälliger
Kosten	teuer	<b><i>günstiger</i></b>
Führungskanüle	ungenauer in Stereotakten einzuspannen	<b><i>exakter implantierbar</i></b>

#### Schlauchmaterial (*Tubing*)

Die Verschlauchung bestand aus FEP<sup>8</sup>-*tubing* mit geringem Innendurchmesser, um die Totvolumina gering zu halten. Dabei wurde das *Tubing* entweder von CMA (Art.Nr. 3409501, Fa. Axel Semrau, Sprockhövel, Germany) oder MAB (Art. Nr. MAB 4001004, Fa. TSE, Bad Homburg, Deutschland) bezogen. Größere Unterschiede konnten nicht festgestellt werden, so dass der deutliche Preisvorteil des MAB Materials für dessen Verwendung spricht. Gleiches gilt für die *Tubing*-Adapter (Abb. 9, mittleres und rechtes Bild), die zur Herstellung einer dichten Verbindung ohne Totvolumen zwischen Schlauch und Anschlüssen an *Swiveln*, Perfusatspritzen und *Switches*<sup>9</sup> dienen. Diese werden von beiden Firmen vertrieben.

Ein wichtiger Punkt bei allen Materialien, die mit dem Perfusat bzw. Dialysat in Berührung kommen, ist ihre Inertheit gegenüber diesem. Leider ist dies nicht immer gewährleistet und so können Stoffe abgegeben werden, die in der Analytik stören. Daher muss zuvor das gesamte System *in vitro* in Betrieb genommen werden und das gewonnene “*in vitro* Dialysat” bei gleichen Analysebedingungen daraufhin getestet werden.

#### Wiederverwertbarkeit einzelner Teile

Für die Wiederverwertbarkeit der Verbrauchsmaterialien haben sich unterschiedliche Erfahrungswerte ergeben. *Swivel* können so lange eingesetzt werden, bis deutlich Zeichen einer Undichtigkeit (Verlust an Perfusativolumen, Salzkristalle, Rost) zu erkennen sind. Dieser Zeitraum kann im günstigsten Fall mehrere Monate betragen.

---

<sup>8</sup> Perfluorethylenpropylen-Copolymer, chemisch und in den Eigenschaften vergleichbar mit Teflon®

<sup>9</sup> Schalter zum Umstellen von einem Perfusat auf ein zweites ohne Luft mit einzubringen



Sonden und Schläuche können theoretisch so lange sie intakt, nach außen dicht und durchgängig für Perfusat sind verwendet werden. Jedoch hat die Erfahrung gezeigt, dass es mit zunehmender Einsatzdauer zur Degradation vor allem von DOPAC und Dopamin kommt, was vermutlich auf bakterielle Kontaminationen in Sonden, *Swiveln* und Schläuchen zurückzuführen ist. Durchspülen mit verdünntem Ethanol (max. 50% für längere Anwendung, höher konzentriert nur kurzzeitig, da sonst die Klebestellen der Sonde angegriffen werden) kann nur kurzfristig Abhilfe schaffen. Daher hat es sich als vorteilhaft erwiesen, Sonden höchsten 3 mal und das Tubing zwischen Sondenauslass und *Swivel* nach jeder Dialyse durch neues Material zu ersetzen.

### Parallelmessungen

Als effizient hat sich die gleichzeitige Messung an mehreren Tieren herausgestellt. Durch Verkürzung der Chromatogrammlaufzeit auf weit unter 10 min können bei einem Probenahmeintervall von 30 min maximal 3 Tiere gleichzeitig dialysiert werden. Dazu sind 3 komplette Mikrodialyse-Messplätze bestehend u.a. aus Pumpe, *Switch*<sup>9</sup>, *Swivel*, Käfigaufbau und Fraktionensammler nötig.

### Verwendung von Nomifensin zur Erhöhung der Dopamin-Basalwerte

Ein kritischer Punkt ist der Zusatz eines *Reuptake*-Inhibitors zum Perfusat zur Erhöhung der extrazellulären Dopamin-Konzentration, da hierbei ein unphysiologischer Zustand geschaffen wird. Trotzdem war es in einem Teil der Experimente nicht möglich, auf den Einsatz von Nomifensin, einem Catecholamin-*Reuptake*-Inhibitor (Schacht et al., 1982), zu verzichten. Die eingesetzte Konzentration konnte zunächst von 30  $\mu\text{M}$  (Hauber und Fuchs, 2000) auf 3  $\mu\text{M}$  (5.1, 5.3, 5.4) durch eine verbesserte Analytik (5.5.2) verringert werden. Zur Abschätzung der nomifensininduzierten Erhöhung der basalen Dopamin-Konzentration im Dialysat wurden auch Dopamin-*Peaks* mit einem ungünstigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis ausgewertet. Dies war bei einem Teil der Experimente, bei der das Sondeneinsetzen am Tag zuvor erfolgte und über Nacht nomifensinfrei perfundiert wurde, möglich. Danach führt die Verwendung von 3  $\mu\text{M}$  Nomifensin zu einer Erhöhung der Dopamin-Konzentrationen im Dialysat um ca. 1200 – 1400 % (Abb. 14). Schließlich gelang es, Dopamin-Basalwerte ohne Nomifensin-Zusatz im Perfusat zuverlässig zu messen (5.2).

### Tendenz zur *Drift* der Basalwerte bei Einsatz von Nomifensin

Ein weiteres Problem, das mit dem Einsatz von Nomifensin einhergeht, ist die *Drift* der Dopamin-Basalwerte im Dialysat. Sowohl bei einer Konzentration im Perfusat von 30  $\mu\text{M}$  (Hauber und Fuchs, 2000) als auch von 3  $\mu\text{M}$  (Abb. 14 Kurve II) kommt es zu einem stetigen Anstieg der Dopamin-Werte. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich um einen durch *Reuptake*-Blockade induzierten Effekt handelt. Ein mit der Zeit immer stärkerer Nomifensin-Eintrag ins Gewebe führt zu einem steigenden Maß an Inhibition des *Reuptakes*, was zu einer Erhöhung der extrazellulären Dopamin-Konzentrationen führt.

Allerdings scheint Nomifensin nicht der alleinige Faktor zu sein. Der Zeitpunkt des Sondeneinsatzens spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle. So bleibt die *Drift* der Dopamin-Basalwerte aus bzw. ist weitaus schwächer, wenn die Sonde am Tag vor dem eigentlichen Experiment eingesetzt wird und dann erst am eigentlichen Messtag mit der Perfusion nomifensinhaltiger CSF begonnen wurde (Abb. 14, Anhang).

### Zeitpunkt des Sondeneinsatzens

Der Abstand zwischen Sondeneinsetzen und Beginn der eigentlichen Messung ist ein kritischer Parameter. Die Messung kann erst begonnen werden, wenn sich die Basalwerte von Dopamin eingeschwungen haben. Dies ist üblicherweise nach 2-3 Stunden der Fall. Länger jedoch dauert dies für die Dopamin- bzw. Serotonin-Metabolite (DOPAC, HVA, 5-HIAA), die noch zusätzliche 1-2 Stunden benötigen, um stabile Werte zu erreichen. Da noch nicht im Gleichgewicht befindliche Metabolitenwerte auf eine noch durch das Trauma des Sondeneinsatzens beeinträchtigte Neurochemie schließen lassen, sollte also mit dem Beginn der Messung bis zum Erreichen stabiler Metabolitenwerte gewartet werden.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die Sonden am späten Nachmittag bis Abend vor dem eigentlichen Messtag einzusetzen (ca. 12-16 Stunden vor dem ersten *Baselinesample*), und die Sonden über Nacht mit normalem Fluss, der auch im Experiment verwendet wird, zu perfundieren. So kann im Laufe der normalen Lichtphase des Licht-Dunkel-Zyklus eine Applikation von Stoffen oder physiologischen Stimuli erfolgen. Bei Einsetzen der Sonde erst am Messtag selbst fällt dieser Zeitpunkt oft ans Ende der Lichtphase oder gerade auf den Wechsel zwischen Licht- und Dunkelphase. Dies könnte insbesondere bei physiologischen Stimuli die Vergleichbarkeit einzelner Tiere und einzelner Ergebnisse erschweren.

### 5.5.2. Analytik

#### Besonderheiten der HPLC-Apparatur

Hinsichtlich der einzelnen Komponenten der HPLC-Apparatur wies das eingesetzte System einige Besonderheiten auf: Da zum Erreichen einer möglichst hohen Sensitivität der Analytik ein geringes Rauschen der Chromatographie-*Baseline* wichtig ist, wurde eine sehr pulsationsarme HPLC-Pumpe (Rheos Flux 2000, Buchs, Schweiz) verwendet. Zum Umgang mit den kleinen Volumina der Dialysatfraktionen wurde ein für diese Belange optimierter gekühlter Autosampler (CMA\200) verwendet.

Als Trennsäule wurde eine herkömmliche (*normal bore*<sup>10</sup>, Innendurchmesser 3 mm) C<sub>18</sub> Säule eingesetzt. Zwar wäre das HPLC-System auch für den Einsatz von *microbore* Säulen mit Innendurchmesser unter 1 mm geeignet gewesen. Tests derartiger Säulen zeigten jedoch keine Vorteile. Dies hat mehrere Gründe: Zwar liefern englumigere Säulen einen wesentlich "schärferen" Peak, jedoch ist das Injektionsvolumen auf 5 µl (in Ausnahmefällen bis 20 µl) beschränkt. Es können so zwar geringere Stoffmengen pro Injektion detektiert werden, diese stammen aber auch aus geringeren Probenvolumina, so dass das Detektionslimit bezüglich der Konzentration nur geringfügig verbessert werden kann. Zudem sind *microbore* Säulen aufgrund ihres geringen Innendurchmessers anfälliger gegenüber eingetragenen Partikeln, so dass die Einsatzdauer derartiger Säulen wesentlich kürzer ist. Schließlich sollten *microbore* Säulen in Kombination mit speziellen bzw. an *microbore* Bedingungen angepassten konventionellen Detektorzellen verwendet werden, da nur so das volle Potenzial ausgeschöpft wird. Andernfalls würde ein vermeintlich schärferer Peak im grossen Volumen der Messkammer unnötig verdünnt, was wiederum zur Abschwächung des Detektorsignales führt. Der Einsatz von *microbore* Säulen ist also nur dann sinnvoll, wenn extrem kleine Probenvolumina z.B. als Folge kurzer Probenahmeintervalle vorliegen, das Aufteilen einer Dialysatfraktion für weitere Analysen nötig ist oder die Notwendigkeit für Mehrfachbestimmungen besteht.

Die Trennsäulen können so lange verwendet werden, wie die Trennung zufriedenstellend ist (ausschlaggebend ist die *Peak*-Symmetrie bei in etwa gleichbleibender Sensitivität) und der Druck nicht in kritische Bereiche steigt. Einige Tausend Injektionen sind durchaus möglich.

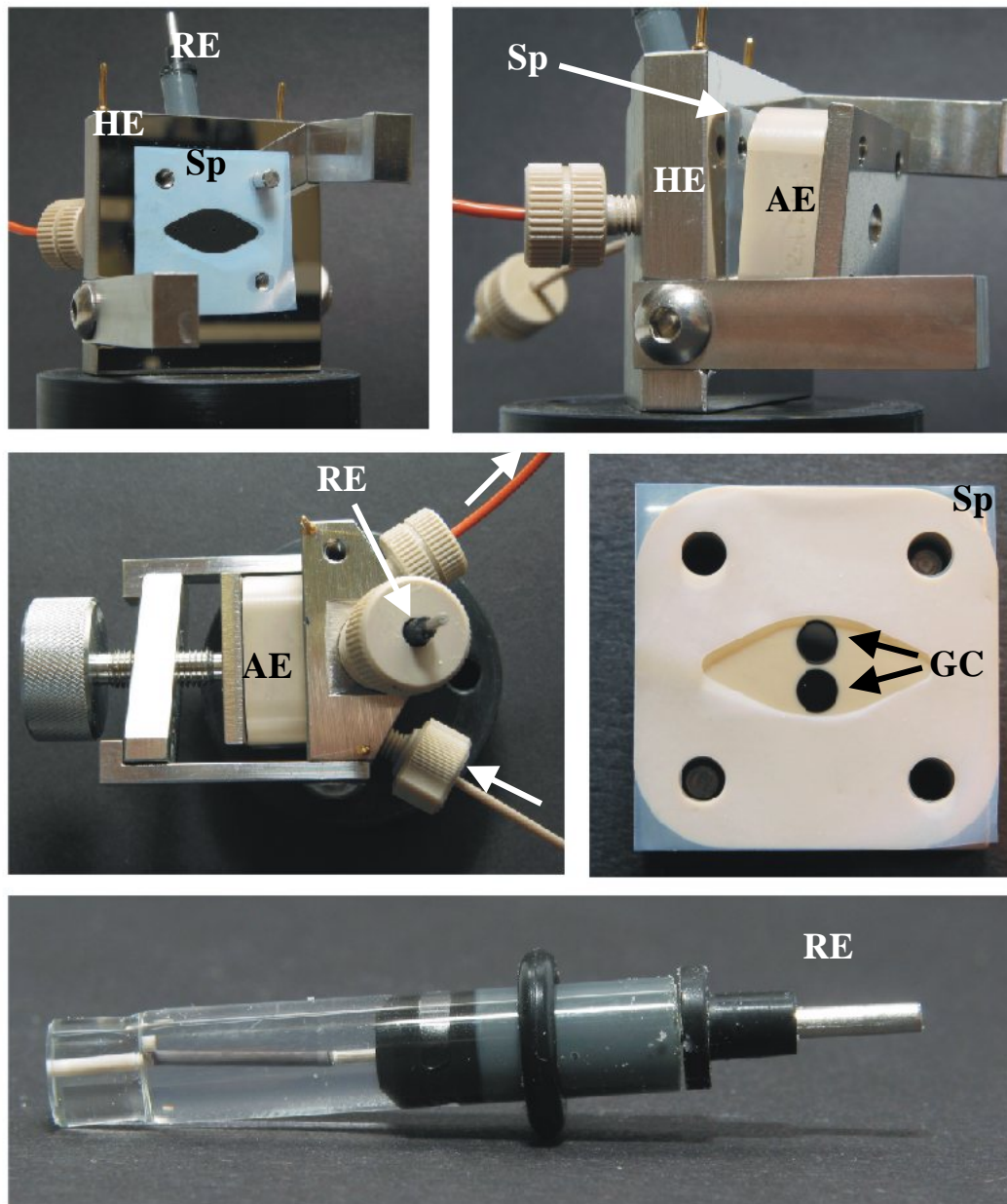
Die elektrochemische Detektion ist der anfälligste Teil der Analytik, da der Detektor im Bereich der höchsten Verstärkung betrieben werden muss, um basale Dopamin-Konzentrationen im Dialysat messen zu können. Als großer Vorteil hat sich die Verwendung

---

<sup>10</sup> konventionelle normal bore Säulen haben üblicherweise einen Innendurchmesser von 4,6 mm, so dass die verwendeten Säulen bereits an der Grenze zu *narrow bore* (Innendurchmesser um 2 mm) liegen.

eines Zwei-Elektroden-Systems mit zwei getrennten Potentiostaten herausgestellt, so dass die Metabolite bei hohem Oxidationspotenzial (700 mV) und geringer Verstärkung (2-10 nA/Vollausschlag [10 mV Signal]), Dopamin bei höchster Verstärkung (0,1-0,5 nA/Vollausschlag [10 mV Signal] ) und geringerem Oxidationspotenzial (600 mV) gemessen werden konnte.

Als entscheidend für die Sensitivität des Detektors hat sich der Zustand der Arbeitselektrode erwiesen. Diese wurde routinemäßig vor jeder Inbetriebnahme des Systems kurz entsprechend den Herstellerangaben poliert, auch wenn keine sichtbaren Oberflächenveränderungen zu sehen waren. Demgegenüber ist die Referenzelektrode robust, da sie bei sachgemäßer Lagerung in gesättigter NaCl-Lösung (kein KCl !) zwischen den Versuchen nicht wesentlich in ihrer Leistung abfällt. Trotzdem sollte auch sie bei einer systematischen Fehlersuche in Betracht gezogen und ersetzt werden.



**Abb. 11:** Elektroden und Messzelle des Detektors. **Oben links:** Hilfselektrodenblock (HE) mit aufgelegtem *Spacer* (Sp) und eingesetzter Referenzelektrode (RE). Im Bereich der linsenförmigen Aussparung des Spacers befinden sich Bohrungen für Zu- und Ableitung der Messzelle. **Oben rechts:** Hilfselektrodenblock mit lose aufsitzender Arbeitselektrode (AE), dazwischen der *Spacer*, der durch seine Dicke das Volumen der Messzelle bestimmt. **Mitte links:** Zusammengebauter Elektrodenblock mit Zu- und Ablauf zur Messzelle (Pfeile). Im Betrieb werden die entsprechenden Kontakte mit den Potentiostaten verbunden (nicht dargestellt). **Mitte rechts:** Arbeitselektrode mit aufgelegtem *Spacer*. Die beiden schwarzen Kreise sind die Glascarbon-Elektroden (GC, Durchmesser je 3mm), an denen die elektrochemische Reaktion abläuft. Diese werden jeweils von einem separaten Potentiostaten angesteuert. **Unten:** Referenzelektrode.

### Ursache mit der Analytik interferierender Peaks

Neben zu geringen Dopamin-Konzentrationen im Dialysat ist das Auftreten von im Chromatogramm störenden Peaks unbekannter Herkunft die häufigste Ursache für ein Misslingen der Messung. Die meisten *Peaks*, die die Analytik durch Elution in der Nähe des Dopamin-*Peaks* erschweren, sind endogen, d.h. sie stammen aus dem untersuchten Gewebe und die damit verbundenen Analyseprobleme sind nur durch Modifikation des Eluenten (5.5.2) zu umgehen. Eine weitere Quelle sind alle Materialien, die mit dem Perfusat und Dialysat direkt in Kontakt kommen (*Tubing*, *Swivel*, Vorratsspritzen, Sonde, Sammelgefäße [*Vials*], Glasgefäße zur Herstellung des Perfusats wie z.B. Messkolben). Schließlich stellt die Verwendung von Chemikalien und Wasser zur Herstellung des Perfusats ebenfalls eine Quelle für Verunreinigungen dar. Daher ist es unerlässlich, Chemikalien mit dem höchsten Reinheitsgrad (z.B. 'HPLC grade' von Sigma) einzusetzen. Gleiches gilt für das demineralisierte (VE, vollentsalzt) Wasser, das entweder mit Hilfe einer Destille noch einmal destilliert werden oder über eine Reinstwasseranlage aufgereinigt werden sollte. Zur Lagerung der Perfusativorräte empfehlen sich Glasflaschen, die nur für diesen Zweck benutzt werden. Perfusativorräte können gekühlt (Kühlschrank) und dunkel aufbewahrt werden.

### Optimierung des Eluenten

Durch eine veränderte Zusammensetzung der Eluenten kann die Trennung ganz entscheidend beeinflusst werden. Bezogen auf den zur Dopamin-Analytik verwendeten Eluenten (5.1-5.4) wirken sich Veränderungen des Methanolanteils, der Konzentration an Ionenpaarreagenz, des pH und der Eluentenflussrate am deutlichsten auf die Trennung aus. Eine erhöhte Methanolkonzentration verkürzt die Retentionszeit aller Analyten (Dopamin, DOPAC, HVA, 5-HIAA), eine erhöhte Konzentration an Ionenpaarreagenz verlängert selektiv nur die Retentionszeit von Dopamin und eine Absenkung des pH verlängert vor allem die Retentionszeit von DOPAC (Übersicht in Marsden und Joseph, 1986). Eine Erhöhung des Flusses mit der der Eluent gefördert wird, verkürzt die Retentionszeiten aller Analyten, erhöht jedoch den Druck im System. Der Fluss kann also nicht beliebig erhöht werden. Zudem gibt es für die Eluentenflussrate ein Optimum (*Van-Deemter-Optimum*, Übersicht in Meyer, 1990) im mittleren Bereich, abhängig vom Säulenmaterial.

Allgemein gilt, dass die Sensitivität für einen Stoff um so höher ist, je kürzer dessen Retentionszeit bzw. je kleiner der Kapazitätsfaktor (Meyer, 1990) ist. Insofern wäre es wünschenswert, den Dopamin-*Peak* recht früh im Chromatogramm zu platzieren. Da aber abgesehen von den großen *Peaks* von DOPAC und 5-HIAA (5-Hydroxyindolessigsäure,

Hauptmetabolit des Serotonins), die ebenfalls recht früh eluieren, auch viele kleinere störende *Peaks* (s.o.) in diesem Bereich eluieren, ist es schwer einen Bereich der Chromatogramm-*Baseline* zu finden, die frei von derartigen Störungen ist. Erschwerend kommt hinzu, dass Anteil und Vorkommen dieser *Peaks* von Dialyse zu Dialyse unterschiedlich sind und die Stoffe nicht mit einem vertretbaren Aufwand identifiziert werden können. Somit ist eine Simulation mit Standards nicht möglich.

Es war daher nur möglich, ein Trennsystem mit relativ kurzer Retentionszeit für Dopamin zu verwenden, wenn die basalen Konzentrationen durch Nomifensin erhöht wurden. Dann spielen diese kleine *Peaks* keine nennenswerte Rolle mehr.

Daraus wird ersichtlich, dass das Detektionslimit im Dialysat in der Regel höher liegt als in Standards.

Zur Messung der Basalwerte ohne Nomifensin wurde schließlich ein Eluent mit sehr hoher Konzentration des Ionenpaarreagenz gewählt (5.2), so dass Dopamin als letzter Analyt nach HVA eluiert, wo die Chromatogramm-*Baseline* nahezu frei von anderen *Peaks* ist. Zudem wurde durch einen hohen Fluss und Methanolgehalt die Gesamtlaufzeit so verkürzt, dass die einzelnen *Peaks* zwar noch hinreichend getrennt sind, aber Dopamin absolut gesehen früh eluiert (Retentionszeiten zwischen 4 und 5 min bei 500-600  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einem maximalen Druck von 140 bar, siehe Beispielchromatogramm, 5.2-Fig. 2).

Es hat sich außerdem als unverzichtbar herausgestellt, die Analysebedingungen durch geringfügige Änderungen (Zugabe von geringen Mengen Ionenpaarreagenz oder Methanol) auch auf die individuelle Dialyse anzupassen. Innerhalb einer Dialyse wurde mit konstanten Analysebedingungen gearbeitet und zur Quantifizierung entsprechend Kalibrierungen mit Standards durchgeführt.

### Betrieb des HPLC-Systems zwischen den Messungen

Da die Inbetriebnahme eines HPLC-Systems sehr aufwendig ist, wurde das System zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messtagen mit vermindertem Fluss weiterbetrieben. Lag eine Pause von mehreren Tagen dazwischen, so wurde nur der Detektor ausgeschaltet und die Messzelle vom System getrennt und gereinigt. War eine Messpause von mehr als zwei Wochen absehbar, so wurde das gesamte System mit demin. Wasser für ca. 30 min gespült und danach mit 100%igem Methanol für weitere ca. 30 min betrieben. Danach können alle Komponenten abgeschaltet werden. Eine Kristallisation ist ausgeschlossen, ebenfalls eine Verkeimung und die Säule ist in einem stabilen Medium ( $\text{C}_{18}$  Säulen dürfen nicht mit reinem Wasser betrieben werden und sollten bei wässrigen Lösungen immer im sauren Bereich

betrieben werden). Das Spülen mit Methanol ist bei Verunreinigungen der Säule ebenfalls hilfreich.

### Dauer der Verwendung eines Eluenten

Da der Eluent in einem Kreislaufsystem eingesetzt wird, kann er über längere Zeit verwendet werden. Jedoch nimmt mit zunehmender Dauer der Verwendung auch die Anreicherung elektroaktiver Substanzen zu, da durch den geschlossenen Kreislauf auch die injizierten Dialysate in den Eluenten gelangen und immer nur ein kleiner Teil der elektroaktiven Stoffe vom Detektor oxidiert werden. Daher muss bei zu starkem Hintergrundstrom, der am Potentiostaten abgelesen werden kann, ein neuer Eluent angesetzt werden. Sind die Trennbedingungen zufriedenstellend, so bietet sich das Ansetzen größerer Volumina an, was auch dann die Einsatzdauer verlängert. Es empfiehlt sich immer ein Teil des Eluenten ohne oder mit geringem Methanolgehalt zurückzuhalten, um eine bei einer Eluentenanpassung zu hoch eingestellte Methanol- oder Ionenpaarreagenzkonzentration durch Zugabe des Aliquots an unmodifiziertem Eluent wieder rückgängig machen zu können.

### Zusammenfassung der methodischen Anmerkungen

Der Schwerpunkt eines Mikrodialyseexperiments muss auf einer für den untersuchten Stoff optimierten Analytik liegen. Das routinemäßige Auswechseln von Verbrauchsmaterial der Mikrodialyse wie Schläuche und Sonden kann trotz der hohen Kosten die Quote an in technischer Hinsicht erfolgreichen Experimenten beträchtlich erhöhen und dürfte sich dann auch langfristig als ökonomischer erweisen.

Die Mikrodialyse ist wegen ihrer hohen Kosten sowohl für Verbrauchsmaterial als auch für Gerätebeschaffungen, sowie durch einen gerade in der Etablierungsphase hohen Anteil fehlgeschlagener Messungen keine Routinetechnik. Sie sollte nicht für kurzfristige Projekte, z.B. zur Bearbeitung eines Teilaspektes in einem weiteren Kontext von Fragestellungen neu etabliert werden. Bei einer einmal etablierte Mikrodialysetechnik sollte mit größeren Überlappungszeiträumen in personeller Hinsicht für Kontinuität gesorgt werden, da zum Erlernen vieler routinemäßiger Abläufe und Vorbereitungen, die in diesem Kapitel nicht annäherungsweise vollständig dokumentiert werden können, eine längere Einarbeitungszeit nötig ist.



## **6. Zusammenfassende Diskussion**

Nachfolgend sollen die Ergebnisse der durchgeführten Studien (5.1-5.4) zusammenfassend diskutiert werden, wobei auch nicht veröffentlichte bzw. bisher nicht zur Veröffentlichung eingereichte Teilergebnisse (Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16) miteinbezogen werden. Sofern im Folgenden von pallidalem Dopamin gesprochen wird, so steht dies ausschließlich für Dopamin im GP, also dem dorsalen Pallidum.

### **6.1. Herkunft pallidalen Dopamins**

Im Rahmen einer Läsionsstudie (5.1) wurde der Frage nach dem Ursprungsgebiet und der Beschaffenheit der dopaminergen Innervation des GP der Ratte nachgegangen. Die Ergebnisse bestätigen und ergänzen frühere Befunde, dass die dopaminerge Innervation des GP vermutlich ausschließlich der SNc entstammt, da nach Läsion der SNc bei weitgehender Schonung der VTA fast keine TH-Immunreaktivität im GP mehr zu beobachten war. Die Ergebnisse dieser experimentellen Läsionen legen die Vermutung nahe, dass nach experimenteller Zerstörung oder krankheitsbedingter Degeneration der SNc bei Morbus Parkinson neben striatalen Arealen auch extrastriatal dopaminerg innervierte Kerngebiete der Basalganglien von einer Dopamin-Unterversorgung betroffen sind.

Die immunhistochemische Auswertung des GP der Ratte ergab ferner, dass sich die Morphologie dopaminerg Fasern entlang der rostrocaudalen Achse veränderte, was eine Mikroheterogenität der dopaminergen Innervation des GP nahelegt.

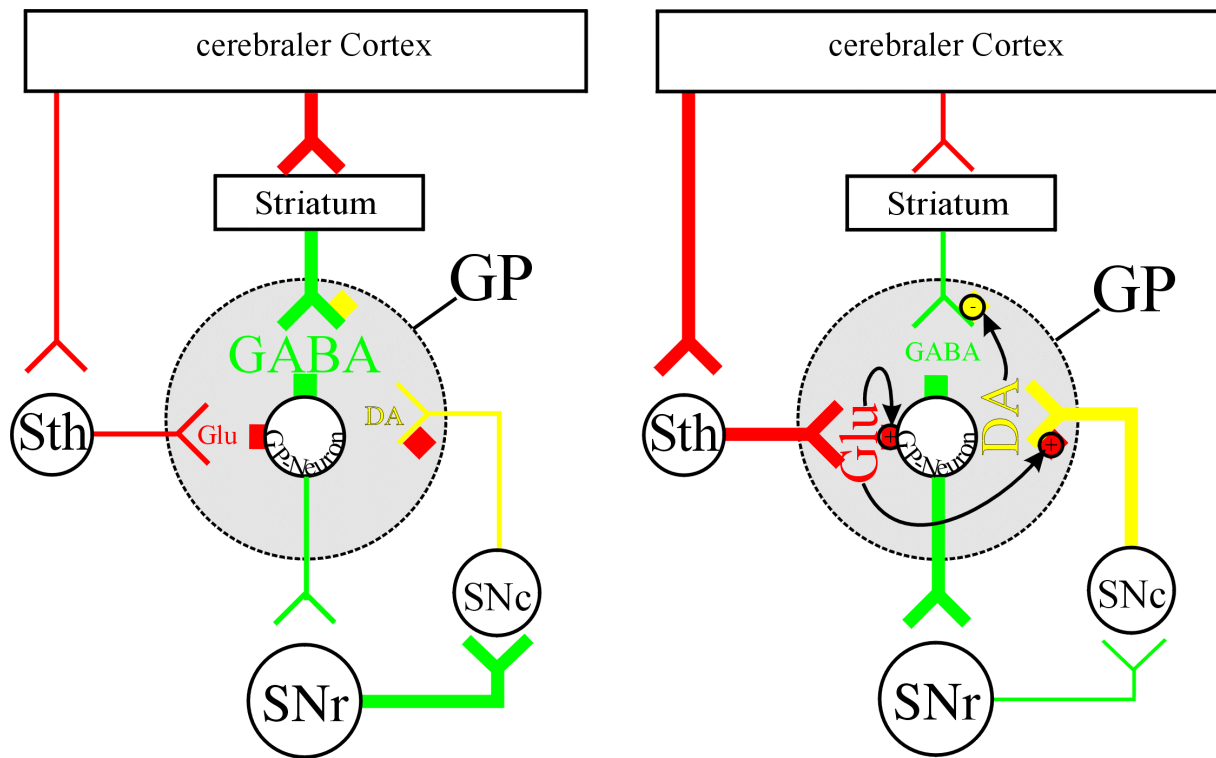
### **6.2. Freisetzung pallidalen Dopamins**

Aufbauend auf den anatomischen Befunden, wurde durch neurochemische Messungen mit Hilfe der Mikro dialyse die Dopamin-Freisetzung in diesem Kerngebiet näher charakterisiert. Ein Teilaspekt betraf die Frage, ob Dopamin im GP der Ratte auch im Zuge neuronaler Aktivität, also aktionspotenzialgekoppelt freigesetzt wird. Die TTX-Sensitivität der pallidalen Dopamin-Freisetzung (5.1) wurde hierfür nachgewiesen. Zusammen mit einer früheren Arbeit (Hauber und Fuchs, 2000) steht nun außer Frage, dass die Dopamin-Freisetzung im GP der Ratte spezifisch und neuronaler Herkunft ist, was eine Lücke in den Befunden zur dopaminergen Innervation des GP schließt.

### 6.3. Regulation pallidalen Dopamins durch Glutamat

Im nächsten Teil der Arbeit stellte sich heraus, dass auch andere im GP relevante Transmittersysteme die Dopamin-Freisetzung modulieren. Eine herausragende Rolle spielt dabei Glutamat, das in erster Linie aus Afferenzen des Sth stammt. GP und Sth können zusammen als zentraler Schrittmacher innerhalb der Basalganglien agieren (Plenz und Kitai, 1999, Wichmann und DeLong, 1999), indem Gruppen von Neuronen beider Kerne zeitlich korrelierte Oszillationen in ihrer Aktivität zeigen. Eine starke Kopplung tritt unter pathologischen Bedingungen auf und könnte eine Erklärung für den Tremor bei Parkinson Patienten darstellen (Terman et al., 2002).

Die Ergebnisse der durchgeführten Mikrodialysestudie (5.3) zeigen, dass die Aktivierung von ionotropen Glutamat Rezeptoren vom NMDA- und AMPA-Typ zu einer Erhöhung der Dopamin-Freisetzung im GP führt. Auch wenn es verschiedene Erklärungen für den Wirkungsmechanismus gibt, lässt sich daraus eine zwar spekulative, aber interessante funktionelle Interpretation ableiten. Die durch Glutamat induzierte Dopamin-Freisetzung könnte auf Ebene des GP eine entscheidende Funktion als „*input selector*“ haben, d.h. Dopamin könnte an der Auswahl beteiligt sein, welche von verschiedenen afferenten Bahnen bevorzugt „Zugang“ zum GP erhält. Eine solche Rolle wurde z.B. für den NAcc vorgeschlagen (Floresco et al., 2001). Während subthalamisches Glutamat die Aktivität pallidaler Neurone erhöht, kann pallidales Dopamin die GABA-Freisetzung aus striatopallidalen Afferenz über präsynaptische D2-Rezeptoren hemmen und so den Einfluss striataler Afferenzen auf den GP vermindern. Querejeta et. al. (2001) zeigten, dass intrapallidale D2-Rezeptor-Blockade oder –Aktivierung die Aktivität pallidaler Neurone über die präsynaptische Wirkung auf striatopallidale GABAerge Afferenzen vermindert oder verstärkt, was einer „An-“ bzw. „Abschaltung“ des striatalen Einganges entspricht. Diese „Abschaltung“ striatopallidaler Afferenzen über präsynaptische Mechanismen kann durch subthalamisches Glutamat nicht direkt erfolgen, da Glutamat exzitatorisch wirkt. Mit Hilfe von Dopamin, das über D2-Rezeptoren inhibierend wirkt, ist auf diese Weise eine Vorzeichenumkehr möglich und Dopamin könnte so dazu dienen, unter bestimmten Situationen den Signalfuss innerhalb der Basalganglien ganz neu zu gewichten, was im Einklang mit den Ergebnissen von Querejeta et. al. (2001) steht. Äußerst spekulativ, aber theoretisch denkbar wäre der Fall, dass der Sth, der neben dem Striatum ein Zugangsportal für corticale Afferenzen zu den Basalganglien („*port of entry to the basal ganglia for cortical inputs*“, Wichmann und DeLong, 1999) ist, unter bestimmten Situationen zur Haupteingangsstruktur wird. Diese Situation ist in Abb. 12 skizziert.

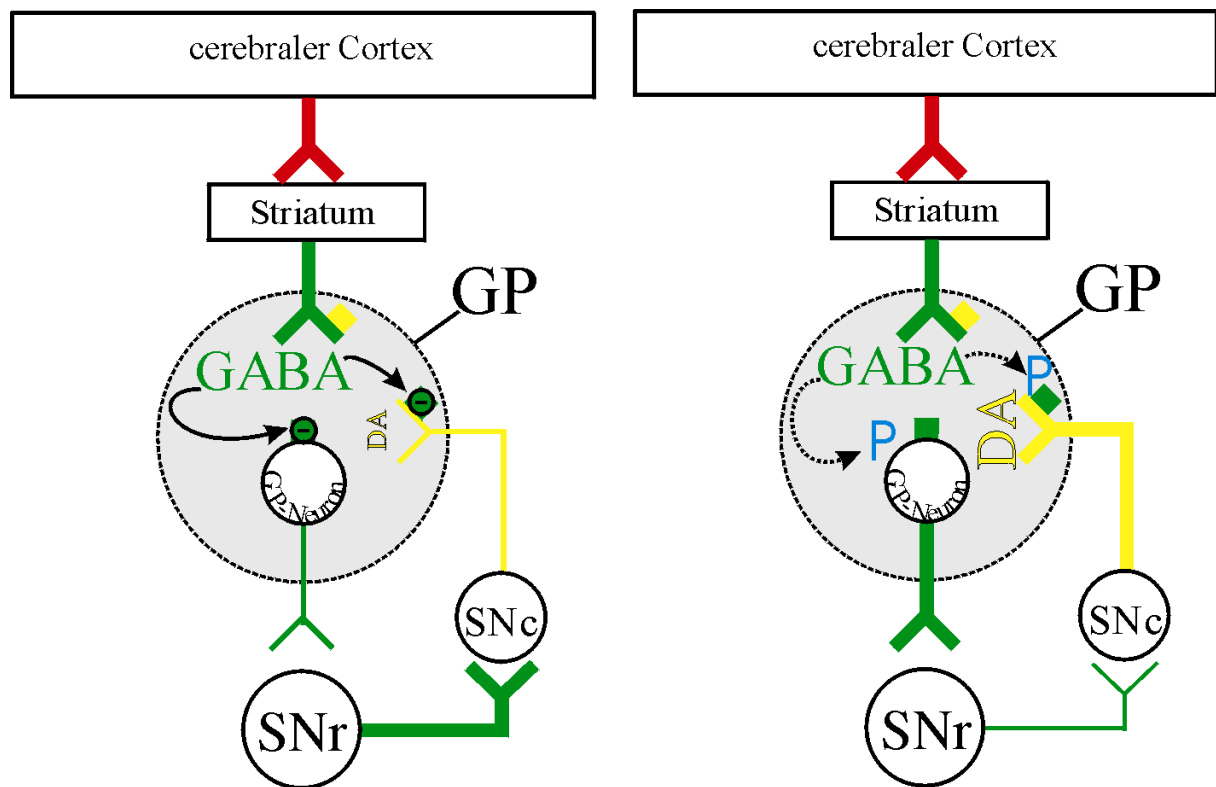


**Abb. 12:** Hypothese zur Rolle von Dopamin bei der Gewichtung pallidaler Afferenzen. Glutamaterge Fasern sind rot, GABAerge grün, dopaminerge gelb und die entsprechenden Rezeptoren als rote, grüne und gelbe Rechtecke eingezeichnet. Dicke Linien symbolisieren verstärkte Aktivität der entsprechenden Projektion, (+) und (-) erregende bzw. hemmende Wirkung. Links: *Zustand 1.* Haupteingangsstruktur ist das Striatum, das über hohe GABA-Spiegel den GP inhibiert, die Glutamat- (Glu) und Dopamin- (DA) Freisetzung ist gering. Rechts: *Zustand 2.* Unter besonderen Umständen werden Signale vom Sth dominierende Eingangssignale, d.h. der Sth wird zur Eingangsstruktur der Basalganglien. Eine erhöhte Glutamat-Freisetzung stimuliert entweder über präsynaptische Glutamat-Rezeptoren auf nigropallidalen Fasern oder postsynaptische Glutamat-Rezeptoren auf pallidalen Neuronen die Dopamin-Freisetzung. Tonisch erhöhte Dopamin-Spiegel im GP hemmen nun über D2-Rezeptoren auf striatopallidalen Afferenzen die GABA-Freisetzung, wodurch der Einfluss des Striatums auf den GP verringert wird.

#### 6.4. Regulation pallidalen Dopamins durch GABA

Neben Glutamat ist GABA im GP der wichtigste Transmitter, da die Projektionsneurone des Striatums den GP tonisch inhibieren (Chevalier und Deniau, 1990). Zudem zeigen elektrophysiologische Befunde, dass die Blockade pallidaler GABA-Rezeptoren dopaminerge Neurone der SNc erregen (Celada et al., 1999). Insofern lag die Vermutung nahe, dass die

Applikation eines GABA-Antagonisten in den GP führt auch zu einer Dopamin-Freisetzung. Diese Vermutung wurde bestätigt. Reverse Mikrodialyse von Picrotoxin, einem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten, führte zu einem Anstieg der pallidalen Dopamin-Spiegel (Abb. 16). Dieser Effekt ist, ähnlich wie im Falle des Glutamats über zwei Mechanismen zu erklären. Entweder kontrollieren präsynaptische GABA-Rezeptoren auf nigropallidalen Afferenzen die Dopamin-Freisetzung oder postsynaptische GABA-Rezeptoren auf pallidalen Neuronen wirken über eine disynaptische Verschaltung unter Beteiligung der SNr, wie sie von Celada et al. (1999) postuliert wird, auf die Aktivität dopaminerger Neurone der SNc, von denen auch die nigropallidale Dopamin-Projektion ausgeht. Beide Mechanismen, in Abb. 13 skizziert, erklären den beobachteten Anstieg von Dopamin im GP nach GABA-Antagonismus.



**Abb. 13:** Mechanismus der durch Picrotoxin induzierten Dopamin-Freisetzung im GP. Abkürzungen und Farben wie in Abb. 12. Links: Grundzustand. GABA inhibiert pallidale Neurone und nigropallidale Afferenzen. Rechts: Picrotoxin (P) blockiert diese Inhibition, so dass pallidale Neurone disinhibiert werden, was folglich zu einer verstärkten Inhibition der SNr, verminderten Inhibition der SNc und damit vermehrten Dopamin-Freisetzung im GP führt. Picrotoxin blockiert ebenfalls potenzielle präsynaptische GABA-Rezeptoren auf nigropallidalen Afferenzen, was ebenfalls zu einer verstärkten Dopamin-Freisetzung im GP führt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte ein Folgeexperiment unter Verwendung eines GABA-Agonisten anstatt des Antagonisten dienen. Zu erwarten wäre dann ein Rückgang der pallidalen Dopamin-Spiegel.

Eine tonische Inhibition pallidaler Dopamin-Freisetzung durch GABA stünde auch in Einklang mit der Hypothese, dass Sth und Striatum unter bestimmten Umständen konkurrierende Eingangsstrukturen der Basalganglien sein könnten (6.3). Sobald die GABA-Konzentrationen im GP steigen, wird gleichzeitig die Dopamin-Freisetzung gehemmt. Ein Absinken des Dopamin-Tonus würde die Inhibition der striatopallidalen Projektion zusätzlich vermindern und so in einer positiven Rückkopplung eine weitere GABA-Freisetzung aus striatopallidalen Afferenzen unterstützen. Das Striatum würde wieder die Rolle als Haupteingangsstruktur der Basalganglien übernehmen. Zwar wäre dieser Ablauf auch ohne die Beteiligung von Dopamin denkbar. Allerdings beschleunigt Dopamin möglicherweise die Prozesse in beiden Richtungen und trägt damit dazu bei, intermediäre Zustände, in denen Sth und Striatum gleichermaßen als Eingangsstruktur gewichtet sind, zu unterbinden.

### **6.5. Regulation pallidalen Dopamins durch Acetylcholin ?**

Innerhalb des GP sind einige wenige acetylcholinerge Neurone zu finden, die vermutlich zum acetylcholinergen System des basalen Vorderhirns gehören. Das Basale-Vorderhirn-System (4.2.1) stellt einen beträchtlichen Anteil des cortical freigesetzten Acetylcholins (Eckenstein et al., 1988) und nimmt so auf die Aktivität des cerebralen Cortex Einfluss. Aufgrund der räumlichen Nähe dopaminerger Terminalen zu acetylcholinergen Neuronen im GP (Rodrigo et al., 1998; Zaborszky und Cullinan, 1996) liegt die Vermutung nahe, dass im GP neben der rein anatomischen Überlappung von Basalganglien- und Basalen-Vorderhirn-Arealen auch eine funktionelle Interaktion zwischen extrastriatal-dopaminergem und acetylcholinergem System stattfinden könnte.

Eine Mikrodialysestudie mit lokaler Applikation des unselektiven Acetylcholin-Agonisten Carbachol (Carbamylcholin) in den GP (Abb. 15) sollte zunächst der Frage nachgehen, ob die Dopamin-Freisetzung im GP durch Acetylcholin reguliert wird. Die Ergebnisse bestätigen dies jedoch nicht. Auch eine pharmakologische Studie, die die c-Fos Expression in corticalen Arealen ipsilateral zu einer unilateralen Infusion von Carbachol oder Amphetamin in den GP untersuchte, konnte einen derartigen Zusammenhang nicht zeigen (Vogelsang, 2002). Da die im Bereich des GP liegenden acetylcholinergen Neurone nur einen sehr kleinen Teil des Basalen-Vorderhirn-Systems ausmachen, spielt deren Modulation auf Ebene des GP und über extrastriatal-dopaminerge Mechanismen vermutlich eine untergeordnete Rolle.

### **6.6. Wirkung physiologischer Stimuli auf pallidales Dopamin**

Nachdem eine grundlegende neurochemische Charakterisierung der Dopamin-Freisetzung im GP der Ratte erfolgt war, bestand eine wichtige Frage darin, inwieweit physiologische Stimuli, von denen bekannt ist, dass sie auf das Verhalten von Ratten maßgeblichen Einfluss haben und die Freisetzung von Dopamin im NAcc erhöhen, ebenfalls eine Reaktion in der Freisetzung pallidalen Dopamins hervorrufen können. Die Ergebnisse (5.2) belegen, dass sowohl belohnende Stimuli wie die Präsentation von unbekanntem wohlschmeckendem Futter als auch aversive Stimuli wie *Handling* eine deutliche Erhöhung der Dopamin-Freisetzung im GP der Ratte nach sich ziehen. Das Ausmaß der Freisetzung ist dabei überraschend stark, so dass der GP dem NAcc in diesem Punkt vergleichbar ist. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass auch nicht-limbische Strukturen, wie der GP an der Verarbeitung und Auswahl appetitiver bzw. aversiver Verhaltensweisen beteiligt sein könnten, was im Einklang mit neueren Arbeiten steht (Baunez et al., 2002). Einschränkend ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Daten korrelativer Natur sind, d.h. ob der GP die Information aus dem Dopamin-Signal auch wirklich weiterverarbeitet oder nicht, kann mit Hilfe der Dopamin-Messung im GP nicht gezeigt werden.

### **6.7. Wirkung pharmakologischer Stimuli auf pallidales Dopamin**

Eine weitere Frage war, ob und wenn ja in welchem Ausmaß auch Pharmaka, die zu einer massiven Dopamin-Freisetzung in striatalen Arealen führen, auch die Dopamin-Freisetzung im GP der Ratte stimulieren können. Hierzu wurden Vergleichsmessungen im NAcc der Ratte durchgeführt, da hierfür keine zum quantitativen Vergleich geeignete Studien in der verfügbaren Literatur vorhanden sind. D-Amphetamin und Cocain, zwei prototypische Pharmaka zur Charakterisierung dopaminergischer Terminalen, die beide auch als Suchtdroge missbraucht werden, wurden lokal und in einem kumulativen Dosierungsprotokoll über reverse Mikrodialyse appliziert. Wieder zeigten die Ergebnisse (5.2) einen dem NAcc vergleichbaren Anstieg der Dopamin-Spiegel im GP, der in beiden Arealen dosisabhängig war. Das Ausmaß der Freisetzung ist angesichts der vom anatomischen Standpunkt als spärlich zu beurteilenden dopaminergen Innervation des GP überraschend. Die pallidalen Terminalen müssen also über einen höchsteffizienten Mechanismus verfügen, um aus wenigen freisetzenden Strukturen (Terminalen, Varikositäten) ein sehr starkes extrazelluläres Dopamin-Signal erzeugen zu können. Eine mögliche Erklärung wäre eine effektivere Dopamin-Synthese mit intrazellulären Dopamin-Konzentrationen. Indiz dafür könnte der im

Vergleich zum NAcc im GP beobachtete geringere Rückgang des Hauptmetaboliten DOPAC auf Amphetamin-Applikation sein (Fig. 6 in 5.2). DOPAC wird allgemein als Marker für den cytoplasmatischen Dopamin-Pool gesehen (Zetterstrom et al., 1988; Arbuthnott et al., 1990) der mit dem vesikulären Dopamin-Pool gekoppelt ist (Fairbrother et al., 1990a, 1990b).

Die Stärke der durch Amphetamin und Cocain induzierten Dopamin-Freisetzung im GP unterstützen zudem Hypothesen, wonach auch Kerngebiete der Basalganglien außerhalb des Belohnungssystemes, z.B. motorische Strukturen wie das dorsale Striatum, an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Sucht beteiligt sein könnten (Kelley und Berridge, 2002). Selbstverabreichungsexperimente von Cocain oder D-Amphetamin in den GP von Ratten gekoppelt mit konditionierten Platzpräferenz Tests könnten darüber Aufschluss geben.

### **6.8. Wirkung von Neuroleptika auf pallidales Dopamin**

Neuroleptika, eine Gruppe von Psychopharmaka mit denen an Schizophrenie und Psychosen leidende Menschen behandelt werden, greifen in die Dopamin-Neurotransmission ein. Man unterteilt sie in typische oder atypische Neuroleptika aufgrund ihres unterschiedlichen Nebenwirkungsprofils. Eine bis heute nur unzureichend geklärte Frage ist, wodurch die atypischen Neuroleptika bei sehr guter therapeutischer Wirksamkeit weitaus seltener und in der Ausprägung schwächere extrapyramidalmotorische Störungen hervorrufen als die typischen. Neuroleptika bewirken in striatalen und corticalen Arealen eine kompensatorische Dopamin-Freisetzung (Westerink et al., 2001), da sie Dopamin-Rezeptoren der D2-Familie blockieren, die als Autorezeptoren die Dopamin-Freisetzung präsynaptisch regulieren (4.3.3). Mikrodialysmessungen sollten der Frage nachgehen, ob dies auch auf pallidaler Ebene zu beobachten ist und wenn ja, ob sich typische und atypische Neuroleptika in diesem Punkt unterscheiden. Dazu wurden Vertreter beider Klassen, Clozapin als Prototyp eines atypischen, Haloperidol und Racloprid als Vertreter typischer Neuroleptika, sowohl systemisch als auch lokal in den GP über reverse Mikrodialyse appliziert und die Reaktion der Dopamin-Spiegel im GP der Ratte gemessen (5.4). Die systemische Applikation führte in beiden Fällen zu einer signifikanten Dopamin-Freisetzung im GP, auch wenn der zeitliche Verlauf im Falle des Clozapins eher auf eine transiente Erhöhung im Vergleich zu einer eher permanenten Erhöhung im Falle des Haloperidols schließen lässt. Lokal führt Clozapin und Racloprid, das aufgrund seiner Löslichkeitseigenschaften als Ersatz für Haloperidol für die reverse Mikrodialyse eingesetzt wurde, nur in der höchsten eingesetzten Konzentration, bei der unspezifische Effekte wahrscheinlich nicht auszuschließen sind, zu einer signifikanten Erhöhung der Dopamin-Spiegel im GP. Die Daten lassen keine Schlüsse zu, die eine

Erklärung des unterschiedlichen Nebenwirkungsprofils auf die Beteiligung pallidaler Dopamins zurückführen ließen. Klar wird jedoch, dass auch extrastriales Dopamin innerhalb der Basalganglien auf Therapeutika, die in die dopaminerge Neurotransmission eingreifen, reagiert.

Das Ausbleiben einer kompensatorischen Dopamin-Freisetzung auf Racloprid, einem hochselektiven D2-Rezeptor-Antagonisten, legt den Schluss nahe, dass im GP entweder keine D2-Autorezeptoren lokalisiert sind, oder aber der physiologische Dopamin-Tonus nicht zu einer Aktivierung von D2-Autorezeptoren ausreicht. Dies ist ein grundlegender Unterschied zum Striatum, in dem präsynaptische Dopamin-Terminalen über D2-Rezeptoren tonisch inhibiert werden (Grace, 1995). Dies bedeutet auch nicht, dass im GP generell kein funktionell relevanter Dopamin-Tonus herrscht. So zeigen die Befunde von Querejeta et. al. (2001), dass die D2-Rezeptoren auf striatopallidalen Afferenzen tonisch durch Dopamin aktiviert sind und damit die GABA-Freisetzung tonisch inhibiert wird.

### **6.9. Einfluss von Nomifensin auf die Stimulus-induzierte Dopamin-Freisetzung im GP**

Die Verwendung einer optimierten Dopamin-Analytik war die Voraussetzung um Dopamin-Basalwerte im GP der Ratte mit geringen Nomifensin-Konzentrationen und schließlich ohne Nomifensin messen zu können. Als vorteilhaft erwies sich die Verwendung eines Trennsystems mit einer im Vergleich zu den Hauptmetaboliten längeren Retentionszeit für Dopamin, so dass dieses als letzter Analyt eluiert. Der Vergleich von Messungen mit und ohne Nomifensin legt den Schluss nahe, dass die lokale Applikation von Nomifensin mit reverser Mikrodialyse das Ausmaß der Dopamin-Freisetzung im GP auf einen physiologischen Stimulus nicht wesentlich beeinflusst. So konnte sowohl bei 30  $\mu\text{M}$  Nomifensin im Perfusat (Hauber und Fuchs, 2000) als auch bei der Verwendung nomifensinfreier CSF (5.2) ein etwa 30%iger Anstieg auf einen Futterstimulus beobachtet werden. Auch wenn die direkte Vergleichbarkeit aufgrund leicht unterschiedlicher experimenteller Rahmenbedingungen nicht gegeben ist, so scheint eine *Reuptake*-Inhibition keinen wesentlichen Einfluss auf den relativen Anstieg extrazellulärer Dopamin-Spiegel im GP zu haben. Die Tatsache, dass auch ohne *Reuptake*-Inhibition physiologische Stimuli zu einer deutlichen Dopamin-Freisetzung im GP führen, legt den Schluss nahe, dass es sich um ein extrasynaptisches Signal im Sinne der Volumentransmission handelt.



### **6.10. Mögliche Mikrodialyse-Folgeexperimente**

Zur Klärung der Frage, ob eine tonische Erhöhung pallidaler Dopamin-Spiegel tatsächlich zu einer veränderten Aktivität pallidaler Neurone und nachgeschalteter Kerne der Basalganglien führt, wäre ein Zwei-Sonden-Ansatz geeignet. Eine Sonde würde in den GP implantiert und könnte dort lokal über reverse Mikrodialyse Dopamin, Dopamin-Rezeptor-Agonisten oder Dopamin-Reuptake-Inhibitoren applizieren. Gleichzeitig könnte über diese Sonde die lokale Freisetzung von GABA, Glutamat und Dopamin gemessen werden. Eine zweite Sonde in nachgeschalteten Kernen, wie z.B. dem Sth, der SNr oder dem EP könnte dann eine veränderte GABA-Freisetzung, die auf eine veränderte Aktivität pallidaler Afferenzen hinweisen würde, messen. Dieser Ansatz ist jedoch mit erheblichen technischen Schwierigkeiten verbunden, da ein Zwei-Sonden-Mikrodialysesystem wesentlich schwieriger zu betreiben ist. Zudem müsste parallel ein HPLC-System zur Aminosäureanalytik zur Verfügung stehen.

### **6.11. Schlussfolgerung**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der GP der Ratte eine funktionelle dopaminerge Innervation aus der SNc erhält, die auf eine Reihe physiologischer und pharmakologischer Stimuli reagiert. Es findet offenbar keine über D2-Autorezeptoren vermittelte Regulation der Dopamin-Freisetzung im GP der Ratte statt. Des Weiteren kann über die Neurotransmitter Glutamat und GABA der Dopamin-Spiegel reguliert werden. Über diesen Mechanismus könnte der Sth unter bestimmten Voraussetzungen zur bevorzugten Eingangsstruktur des GP und damit der Basalganglien werden. Offen bleibt die Frage, ob der GP das Zielgebiet eines von der nigrostriatalen Projektion abgetrennten nigropallidalen dopaminergen Systems ist und ein spezifisches Dopamin-Signal erhält oder aber ein Kerngebiet von mehreren ist, in welches dasselbe vom Mittelhirn ausgesandte Dopamin-Signal gelangt. Weitere Studien sind zur Klärung dieser Frage nötig.

## 7. Literaturverzeichnis

Soweit es sich um Aufsätze aus Zeitschriften handelt, ist der abgekürzte Titel der Zeitschrift kursiv dargestellt, entsprechend der in MEDLINE<sup>®</sup> verwendeten Abkürzungen (*Index Medicus*).

- Agnati L. F., Zoli M., Stromberg I., Fuxe K. (1995) Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience* 69:711-26.
- Albin R. L., Young A. B., Penney J. B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-75.
- Alexander G. E., Crutcher M. D. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-71.
- Alexi T., Borlongan C. V., Faull R. L., Williams C. E., Clark R. G., Gluckman P. D., Hughes P. E. (2000) Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol* 60:409-70.
- Arbuthnott G. W., Fairbrother I. S., Butcher S. P. (1990) Dopamine release and metabolism in the rat striatum: an analysis by 'in vivo' brain microdialysis. *Pharmacol Ther* 48:281-93.
- Ariano M. A., Wang J., Noblett K. L., Larson E. R., Sibley D. R. (1997) Cellular distribution of the rat D4 dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera. *Brain Res* 752:26-34.
- Arluison M., Dietl M., Thibault J. (1984) Ultrastructural morphology of dopaminergic nerve terminals and synapses in the striatum of the rat using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry: a topographical study. *Brain Res Bull* 13:269-85.
- Bannon M. J., Granneman J. G., Kapatos G. (1995) The dopamine transporter. In: Psychopharmacology: the fourth generation of progress (Bloom F. E., Kupfer D. J., eds), pp 179-188. New York: Raven Press Ltd.
- Bassareo V., Di Chiara G. (1997) Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 17:851-61.
- Baunez C., Amalric M., Robbins T. W. (2002) Enhanced food-related motivation after bilateral lesions of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 22:562-8.
- Bergman H., Feingold A., Nini A., Raz A., Slovin H., Abeles M., Vaadia E. (1998) Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci* 21:32-8.
- Bergson C., Mrzljak L., Smiley J. F., Pappy M., Levenson R., Goldman-Rakic P. S. (1995) Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 15:7821-36.
- Bergstrom D. A., Walters J. R. (1984) Dopamine attenuates the effects of GABA on single unit activity in the globus pallidus. *Brain Res* 310:23-33.
- Berridge K. C., Robinson T. E. (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28:309-69.
- Bevan M. D., Booth P. A., Eaton S. A., Bolam J. P. (1998) Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *J Neurosci* 18:9438-52.
- Bezard E., Boraud T., Chalon S., Brochie J. M., Guilloteau D., Gross C. E. (2001) Pallidal border cells: an anatomical and electrophysiological study in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkey. *Neuroscience* 103:117-23.
- Bito L., Davson H., Levin E., Murray M., Snider N. (1966) The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J Neurochem* 13:1057-67.

- Boyson S. J., McGonigle P., Molinoff P. B. (1986) Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J Neurosci* 6:3177-88.
- Brown P., Marsden C. D. (1998) What do the basal ganglia do? *Lancet* 351:1801-4.
- Bubser M., Deutch A. Y. (2002) Differential effects of typical and atypical antipsychotic drugs on striosome and matrix compartments of the striatum. *Eur J Neurosci* 15:713-20.
- Camps M., Kelly P. H., Palacios J. M. (1990) Autoradiographic localization of dopamine D 1 and D 2 receptors in the brain of several mammalian species. *J Neural Transm Gen Sect* 80:105-27.
- Celada P., Paladini C. A., Tepper J. M. (1999) GABAergic control of rat substantia nigra dopaminergic neurons: role of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 89:813-25.
- Charara A., Parent A. (1994) Brainstem dopaminergic, cholinergic and serotonergic afferents to the pallidum in the squirrel monkey. *Brain Res* 640:155-70.
- Chesselet M. F., Delfs J. M. (1996) Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci* 19:417-22.
- Chevalier G., Deniau J. M. (1990) Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends Neurosci* 13:277-80.
- Ciliax B. J., Nash N., Heilman C., Sunahara R., Hartney A., Tiberi M., Rye D. B., Caron M. G., Niznik H. B., Levey A. I. (2000) Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse* 37:125-45.
- Cooper J. R., Bloom F. E., Roth R. H. (1991) Dopamine. In: *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, 6 Edition (Cooper J. R., Bloom F. E., Roth R. H., eds), pp 285-337. Oxford: Oxford University Press.
- Cooper A. J., Stanford I. M. (2000) Electrophysiological and morphological characteristics of three subtypes of rat globus pallidus neurone in vitro [In Process Citation]. *J Physiol* 527 Pt 2:291-304.
- Cossette M., Levesque M., Parent A. (1999) Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neurosci Res* 34:51-4.
- Costall B., Naylor R. J., Olley J. E. (1972) Catalepsy and circling behaviour after intracerebral injections of neuroleptic, cholinergic and anticholinergic agents into the caudate-putamen, globus pallidus and substantia nigra of rat brain. *Neuropharmacology* 11:645-63.
- Coward D. M. (1992) General pharmacology of clozapine. *Br J Psychiatry Suppl* :5-11.
- Dayne Mayfield R., Larson G., Orona R. A., Zahniser N. R. (1996) Opposing actions of adenosine A2a and dopamine D2 receptor activation on GABA release in the basal ganglia: evidence for an A2a/D2 receptor interaction in globus pallidus. *Synapse* 22:132-8.
- Deschenes M., Bourassa J., Doan V. D., Parent A. (1996) A single-cell study of the axonal projections arising from the posterior intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Eur J Neurosci* 8:329-43.
- Di Chiara G. (1999) Drug addiction as dopamine-dependent learning disorder. *Eur J Pharmacol* 375:13-30.
- Eckenstein F. P., Baughman R. W., Quinn J. (1988) An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 25:457-74.
- Fairbrother I. S., Arbuthnott G. W., Kelly J. S., Butcher S. P. (1990a) In vivo mechanisms underlying dopamine release from rat nigrostriatal terminals: II. Studies using potassium and tyramine. *J Neurochem* 54:1844-51.
- Fairbrother I. S., Arbuthnott G. W., Kelly J. S., Butcher S. P. (1990b) In vivo mechanisms underlying dopamine release from rat nigrostriatal terminals: I. Studies using veratrine and ouabain. *J Neurochem* 54:1834-43.
- Fallon J. H., Moore R. Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180:545-80.

- Feenstra M. G., Teske G., Botterblom M. H., De Bruin J. P. (1999) Dopamine and noradrenaline release in the prefrontal cortex of rats during classical aversive and appetitive conditioning to a contextual stimulus: interference by novelty effects. *Neurosci Lett* 272:179-82.
- Filion M., Tremblay L., Bedard P. J. (1991) Effects of dopamine agonists on the spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain Res* 547:152-61.
- Floran B., Aceves J., Sierra A., Martinez-Fong D. (1990) Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett* 116:136-40.
- Floran B., Floran L., Sierra A., Aceves J. (1997) D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett* 237:1-4.
- Floresco S. B., Blaha C. D., Yang C. R., Phillips A. G. (2001) Modulation of hippocampal and amygdalar-evoked activity of nucleus accumbens neurons by dopamine: cellular mechanisms of input selection. *J Neurosci* 21:2851-60.
- Fox C. A., Mansour A., Thompson R. C., Bunzow J. R., Civelli O., Watson S. J., Jr. (1993) The distribution of dopamine D2 receptor heteronuclear RNA (hnRNA) in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 6:363-73.
- Fuchs H. (1999) In vivo Mikrodialysemessungen zur Dopaminfreisetzung im Globus pallidus der Ratte. Diplomarbeit, Abteilung Tierphysiologie des Biologischen Institutes. Universität Stuttgart.
- Fuxe K., Agnati L. F., Kalia M., Goldstein M., Andersson K., Härfstrand A. (1985) Dopaminergic systems in the brain and pituitary: Springer Sandoz.
- Galvan A., Floran B., Eriş D., Aceves J. (2001) Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J Neural Transm* 108:153-66.
- Garris P. A., Ciolkowski E. L., Pastore P., Wightman R. M. (1994) Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. *J Neurosci* 14:6084-93.
- Gash D. M., Zhang Z., Ovidia A., Cass W. A., Yi A., Simmerman L., Russell D., Martin D., Lapchak P. A., Collins F., Hoffer B. J., Gerhardt G. A. (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380:252-5.
- Gauthier J., Parent M., Parent A. (1999) The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res* 834:228-232.
- Gaykema R. P., Zaborszky L. (1996) Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. II. Substantia nigra-ventral tegmental area projections to cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 374:555-77.
- Gerfen C. R. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 15:133-9.
- Gerfen C. R., Wilson C. J. (1996) The Basal Ganglia: Elsevier Science.
- Glass M., Dragunow M., Faull R. L. (2000) The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97:505-19.
- Glinka Y., Gassen M., Youdim M. B. (1997) Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl* 50:55-66.
- Gnanalingham K. K., Milkowski N. A., Smith L. A., Hunter A. J., Jenner P., Marsden C. D. (1995) Short and long-term changes in cerebral [14C]-2-deoxyglucose uptake in the MPTP-treated marmoset: relationship to locomotor activity. *J Neural Transm Gen Sect* 101:65-82.
- Graybiel A. M. (1997) The basal ganglia and cognitive pattern generators. *Schizophrenia Bull* 23:459-469.

- Grace A. A. (1995) The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function. *Drug Alcohol Depend* 37:111-29.
- Gurevich E. V., Joyce J. N. (1999) Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons. *Neuropsychopharmacology* 20:60-80.
- Habermehl G. (1984) Tetrodo-Toxische Fische. In: Gift- Tiere und ihre Waffen: eine Einführung für Biologen, Chemiker und Mediziner; ein Leitfaden für Touristen (Habermehl G., ed). Berlin Heidelberg NewYork: Springer Verlag.
- Hall H., Kohler C., Gawell L., Farde L., Sedvall G. (1988) Raclopride, a new selective ligand for the dopamine-D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12:559-68.
- Hall H., Ogren S. O., Kohler C., Magnusson O. (1989) Animal pharmacology of raclopride, a selective dopamine D2 antagonist. *Psychopharmacol Ser* 7:123-30.
- Hassani O. K., Francois C., Yelnik J., Feger J. (1997) Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 749:88-94.
- Hauber W., Lutz S. (1999) Dopamine D1 or D2 receptor blockade in the globus pallidus produces akinesia in the rat. *Behav Brain Res* 106:143-50.
- Hauber W., Lutz S. (1999) Blockade of dopamine D2, but not of D1 receptors in the rat globus pallidus induced Fos-like immunoreactivity in the caudate-putamen, substantia nigra and entopeduncular nucleus. *Neurosci Lett* 271:73-6.
- Hauber W., Fuchs H. (2000) Dopamine release in the rat globus pallidus characterised by in vivo microdialysis. *Behav Brain Res* 111:39-44.
- Hedreen J. C. (1999) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive elements in the human globus pallidus and subthalamic nucleus. *J Comp Neurol* 409:400-10.
- Heimer L. (2000) Basal forebrain in the context of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31:205-35.
- Heimer L., Zahm D., Alheid G. (1995) Basal Ganglia. In: The rat nervous system, 2 Edition (Paxinos G., ed), pp 579-627: Academic Press.
- Heimer L., Harlan R. E., Alheid G. F., Garcia M. M., de Olmos J. (1997) Substantia innominata: a notion which impedes clinical-anatomical correlations in neuropsychiatric disorders. *Neuroscience* 76:957-1006.
- Hoebel B. G., Hernandez L., Schwartz D. H., Mark G. P., Hunter G. A. (1989) Microdialysis studies of brain norepinephrine, serotonin, and dopamine release during ingestive behavior. Theoretical and clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 575:171-91.
- Hornykiewicz O. (1998) Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 51:S2-9.
- Hornykiewicz O. (2001) Chemical neuroanatomy of the basal ganglia-normal and in Parkinson's disease. *J Chem Neuroanat* 22:3-12.
- Horvitz J. C. (2000) Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 96:651-6.
- Hurley M. J., Mash D. C., Jenner P. (2001) Dopamine D(1) receptor expression in human basal ganglia and changes in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 87:271-9.
- Hutchinson W. D., Levy R., Dostrovsky J. O., Lozano A. M., Lang A. E. (1997) Effects of apomorphine on globus pallidus neurons in parkinsonian patients. *Ann Neurol* 42:767-75.
- Jan C., François C., Tandé D., Yelnik J., Tremblay L., Agid Y., Hirsch E. (2000) Dopaminergic innervation of the pallidum in the normal state, in MPTP-treated monkeys and in parkinsonian patients. *EJN* 12:4525-4535.
- Joel D., Weiner I. (2000) The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience* 96:451-74.
- Jones B. E. (1993) The organization of central cholinergic systems and their functional importance in sleep-waking states. *Prog Brain Res* 98:61-71.

- Jones D. L., Mogenson G. J. (1980a) Nucleus accumbens to globus pallidus GABA projection subserving ambulatory activity. *Am J Physiol* 238:R65-9.
- Jones D. L., Mogenson G. J. (1980b) Nucleus accumbens to globus pallidus GABA projection: electrophysiological and iontophoretic investigations. *Brain Res* 188:93-105.
- Kalivas P. W., Nakamura M. (1999) Neural systems for behavioral activation and reward. *Curr Opin Neurobiol* 9:223-7.
- Kao C. Y. (1972) Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin. *Fed Proc* 31:1117-23.
- Kelland M. D., Soltis R. P., Anderson L. A., Bergstrom D. A., Walters J. R. (1995) In vivo characterization of two cell types in the rat globus pallidus which have opposite responses to dopamine receptor stimulation: comparison of electrophysiological properties and responses to apomorphine, dizocilpine, and ketamine anesthesia. *Synapse* 20:338-50.
- Kelley A. E., Berridge K. C. (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22:3306-11.
- Kessler R. M., Whetsell W. O., Ansari M. S., Votaw J. R., de Paulis T., Clanton J. A., Schmidt D. E., Mason N. S., Manning R. G. (1993) Identification of extrastriatal dopamine D2 receptors in post mortem human brain with [125I]epidepride. *Brain Res* 609:237-43.
- Khan Z. U., Mrzljak L., Gutierrez A., de la Calle A., Goldman-Rakic P. S. (1998) Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7731-6.
- Kruk Z. L., Pycock C. J. (1991) Dopamine. *In: Neurotransmitters and drugs* (Kruk Z. L., Pycock C. J., eds), pp 87-116. London New York: Chapman & Hall.
- Larson E. R., Ariano M. A. (1995) D3 and D2 dopamine receptors: visualization of cellular expression patterns in motor and limbic structures. *Synapse* 20:325-37.
- Lavoie B., Smith Y., Parent A. (1989) Dopaminergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 289:36-52.
- Levesque D., Diaz J., Pilon C., Martres M. P., Giros B., Souil E., Schott D., Morgat J. L., Schwartz J. C., Sokoloff P. (1992) Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8155-9.
- Levey A. I., Hersch S. M., Rye D. B., Sunahara R. K., Niznik H. B., Kitt C. A., Price D. L., Maggio R., Brann M. R., Ciliax B. J., et al. (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8861-5.
- Leviel V. (2001) The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochem Int* 38:83-106.
- Levy R., Hazrati L. N., Herrero M. T., Vila M., Hassani O. K., Mouroux M., Ruberg M., Asensi H., Agid Y., Feger J., Obeso J. A., Parent A., Hirsch E. C. (1997) Re-evaluation of the functional anatomy of the basal ganglia in normal and Parkinsonian states. *Neuroscience* 76:335-43.
- Lexikon der Neurowissenschaften (2001). Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Lindvall O., Björklund A., Hokfelt T., Ljungdahl A. (1973) Application of the glyoxylic acid method to vibratome sections for the improved visualization of central catecholamine neurons. *Histochemie* 35:31-8.
- Lindvall O., Björklund A. (1979) Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 172:169-73.
- Lönnroth P., Jansson P. A., Smith U. (1987) A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am J Physiol* 253:E228-31.
- Löschmann P. A., Schulz J. B. (1997) Degenerative Erkrankungen der Basalganglien. *In: Klinische Neurobiologie* (Herdegen T., Tölle T. R., Bähr M., eds), pp 243-280. Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

- Mansour A., Meador-Woodruff J. H., Bunzow J. R., Civelli O., Akil H., Watson S. J. (1990) Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization- receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci* 10:2587-600.
- Marsden C. A., Joseph M. H. (1986) Biogenic Amines. *In: HPLC of small molecules: a practical approach* (Kim C. K., ed), pp 29-46. Oxford: IRL Press Ltd.
- Marshall J. F., Henry B. L., Billings L. M., Hoover B. R. (2001) The role of the globus pallidus D2 subfamily of dopamine receptors in pallidal immediate early gene expression. *Neuroscience* 105:365-78.
- Masson J., Sagn C., Hamon M., Mestikawy S. E. (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51:439-64.
- McKinney M., Coyle J. T., Hedreen J. C. (1983) Topographic analysis of the innervation of the rat neocortex and hippocampus by the basal forebrain cholinergic system. *J Comp Neurol* 217:103-21.
- McQuade R., Sharp T. (1997) Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J Neurochem* 69:791-6.
- Meibach R. C., Katzman R. (1979) Catecholaminergic innervation of the subthalamic nucleus: evidence for a rostral continuation of the A9 (substantia nigra) dopaminergic cell group. *Brain Res* 173:364-8.
- Meltzer H. Y. (1994) An overview of the mechanism of action of clozapine. *J Clin Psychiatry* 55 Suppl B:47-52.
- Meng S. Z., Ozawa Y., Itoh M., Takashima S. (1999) Developmental and age-related changes of dopamine transporter, and dopamine D1 and D2 receptors in human basal ganglia. *Brain Res* 843:136-44.
- Mennicken F., Savasta M., Peretti-Renucci R., Feuerstein C. (1992) Autoradiographic localization of dopamine uptake sites in the rat brain with 3H-GBR 12935. *J Neural Transm Gen Sect* 87:1-14.
- Meyer, V. M. (1990). *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Band 6, Otto Salle Verlag, Frankfurt a. M
- Miller G. W., Staley J. K., Heilman C. J., Perez J. T., Mash D. C., Rye D. B., Levey A. I. (1997) Immunochemical analysis of dopamine transporter protein in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 41:530-9.
- Miller G. W., Gainetdinov R. R., Levey A. I., Caron M. G. (1999) Dopamine transporters and neuronal injury. *Trends Pharmacol Sci* 20:424-9.
- Millhouse O. E. (1986) Pallidal neurons in the rat. *J Comp Neurol* 254:209-27.
- Morgan J. I., Curran T. (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14:421-51.
- Morrison P. F., Bungay P. M., Hsiao J. K., Mefford I. N., Dykstra K. H., Dedrick R. L. (1991) Quantitative microdialysis. *In: Microdialysis in the neurosciences* (Robinson T. E., Justice J. B. J., eds), pp 47-80. Amsterdam London New York Tokyo: Elsevier Press.
- Mouroux M., Hassani O. K., Feger J. (1997) Electrophysiological and Fos immunohistochemical evidence for the excitatory nature of the parafascicular projection to the globus pallidus. *Neuroscience* 81:387-97.
- Mrzljak L., Bergson C., Pappy M., Huff R., Levenson R., Goldman-Rakic P. S. (1996) Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 381:245-8.
- Murray A. M., Ryoo H. L., Gurevich E., Joyce J. N. (1994) Localization of dopamine D3 receptors to mesolimbic and D2 receptors to mesostriatal regions of human forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11271-5.

- Nakanishi H., Hori N., Kastuda N. (1985) Neostriatal evoked inhibition and effects of dopamine on globus pallidal neurons in rat slice preparations. *Brain Res* 358:282-6.
- Napier T. C., Simson P. E., Givens B. S. (1991) Dopamine electrophysiology of ventral pallidal/substantia innominata neurons: comparison with the dorsal globus pallidus. *J Pharmacol Exp Ther* 258:249-62.
- Nieuwenhuys R. (1985) Chemoarchitecture of the brain. Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer Verlag.
- Ogura M., Kita H. (2000) Dynorphin exerts both postsynaptic and presynaptic effects in the Globus pallidus of the rat. *J Neurophysiol* 83:3366-76.
- Olson R. J., Justice J. B., Jr. (1993) Quantitative microdialysis under transient conditions. *Anal Chem* 65:1017-22.
- Oorschot D. E. (1996) Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol* 366:580-99.
- Paladini C. A., Celada P., Tepper J. M. (1999) Striatal, pallidal, and pars reticulata evoked inhibition of nigrostriatal dopaminergic neurons is mediated by GABA(A) receptors in vivo. *Neuroscience* 89:799-812.
- Parent A., Lavoie B., Smith Y., Bedard P. (1990) The Dopaminergic Nigropallidal Projection in Primates: Distinct Cellular Origin and Relative Sparing in MPTP-Treated Monkeys. In: Advances in Neurology (Streifler M. B., Korczyn A. D., Melamed E., Youdim M. B. H., eds), pp 111-116. New York: Raven Press.
- Parent A., Lavoie B. (1993) Dopaminergic Innervation of the Basal Ganglia in Normal and Parkinsonian Monkeys. In: Current Concepts in Parkinson's Disease Research (Schneider J. S., Gupta M., eds), pp 237-257. Toronto: Hans Huber.
- Parent A., Hazrati L.-N. (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Rev* 20:91-127.
- Parent A., Hazrati L. N. (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20:128-54.
- Parent A., Cicchetti F. (1998) The current model of basal ganglia organization under scrutiny *Mov Disord* 13:199-202.
- Parent A., Sato F., Wu Y., Gauthier J., Levesque M., Parent M. (2000) Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends Neurosci* 23:S20-7.
- Parsons L. H., Justice J. B., Jr. (1994) Quantitative approaches to in vivo brain microdialysis. *Crit Rev Neurobiol* 8:189-220.
- Paxinos G., Watson C. (1986) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, New York: Academic Press.
- Plenz D., Kitai S. T. (1999) A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature* 400:677-82.
- Ploska A., Taquet H., Javoy-Agid F., Gaspar P., Cesselin F., Berger B., Hamon M., Legrand J. C., Agid Y. (1982) Dopamine and methionine-enkephalin in human brain. *Neurosci Lett* 33:191-6.
- Poeck K., Hacke W. (1998) Neurologie. Stuttgart: Springer.
- Prensa L., Cossette M., Parent A. (2000) Dopaminergic innervation of human basal ganglia. *J Chem Neuroanat* 20:207-13.
- Querejeta E., Delgado A., Valdiosera R., Erlij D., Aceves J. (2001) Intrapallidal D(2) dopamine receptors control globus pallidus neuron activity in the rat. *Neurosci Lett* 300:79-82.
- Quik M., Police S., He L., Di Monte D. A., Langston J. W. (2000) Expression of D(3) receptor messenger RNA and binding sites in monkey striatum and substantia nigra after nigrostriatal degeneration: effect of levodopa treatment. *Neuroscience* 98:263-73.

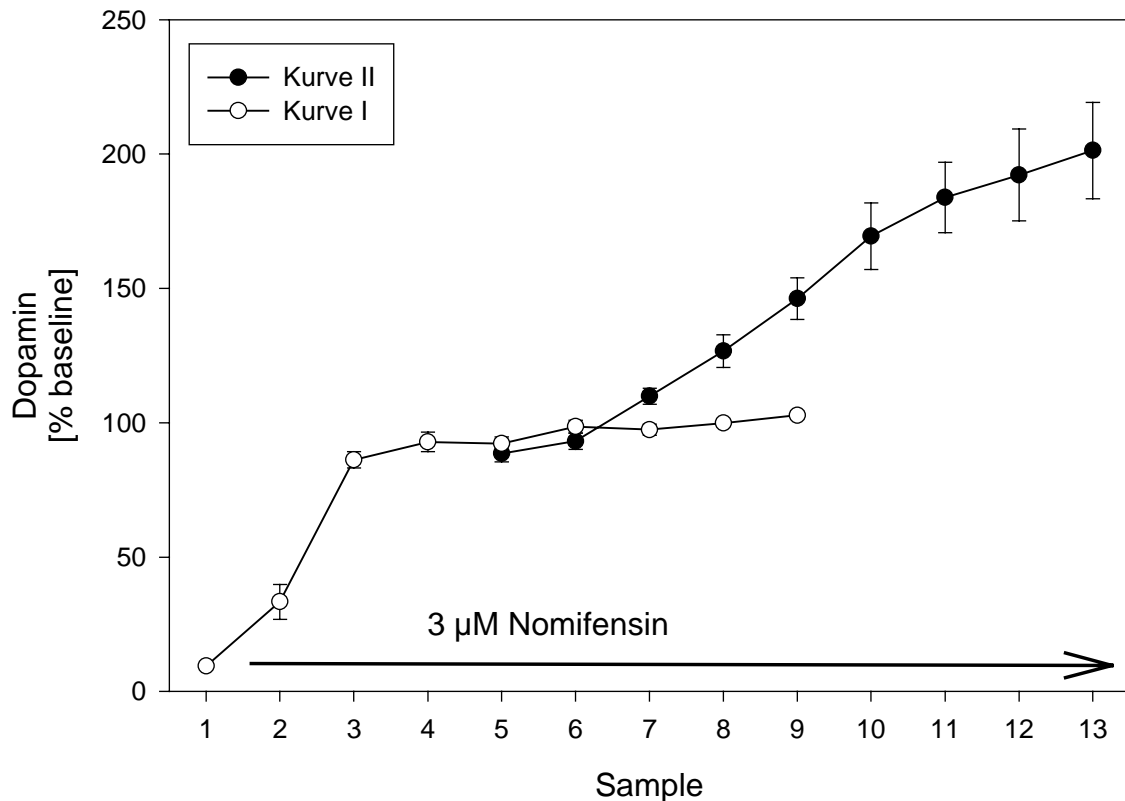


- Redgrave P., Prescott T. J., Gurney K. (1999a) The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience* 89:1009-23.
- Redgrave P., Prescott T. J., Gurney K. (1999b) Is the short-latency dopamine response too short to signal reward error? *Trends Neurosci* 22:146-51.
- Ritchie J. M., Greene N. M. (1991) Local Anesthetics. In: The Pharmacological Basics of Therapeutics, 8<sup>th</sup> edition (Gliman A. G., Rall T. W., Nies A. S., Taylor P., eds), pp 310-331. New York: Pergamon Press.
- Rodrigo J., Fernandez P., Bentura M. L., de Velasco J. M., Serrano J., Uttenthal O., Martinez-Murillo R. (1998) Distribution of catecholaminergic afferent fibres in the rat globus pallidus and their relations with cholinergic neurons. *J Chem Neuroanat* 15:1-20.
- Rosenblad C., Kirik D., Devaux B., Moffat B., Phillips H. S., Björklund A. (1999) Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Eur J Neurosci* 11:1554-66.
- Rosenblad C., Kirik D., Björklund A. (2000) Sequential administration of GDNF into the substantia nigra and striatum promotes dopamine neuron survival and axonal sprouting but not striatal reinnervation or functional recovery in the partial 6-OHDA lesion model. *Exp Neurol* 161:503-16.
- Ruskin D. N., Rawji S. S., Walters J. R. (1998) Effects of full D1 dopamine receptor agonists on firing rates in the globus pallidus and substantia nigra pars compacta in vivo: tests for D1 receptor selectivity and comparisons to the partial agonist SKF 38393. *J Pharmacol Exp Ther* 286:272-81.
- Ruskin D. N., Bergstrom D. A., Kaneoke Y., Patel B. N., Twery M. J., Walters J. R. (1999) Multisecond oscillations in firing rate in the basal ganglia: robust modulation by dopamine receptor activation and anesthesia. *J Neurophysiol* 81:2046-55.
- Ruskin D. N., Bergstrom D. A., Baek D., Freeman L. E., Walters J. R. (2001) Cocaine or selective block of dopamine transporters influences multisecond oscillations in firing rate in the globus pallidus. *Neuropsychopharmacology* 25:28-40.
- Russell V. A., Allin R., Lamm M. C., Taljaard J. J. (1992) Regional distribution of monoamines and dopamine D1- and D2-receptors in the striatum of the rat. *Neurochem Res* 17:387-95.
- Sarter M., Bruno J. P. (2000) Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience* 95:933-52.
- Sato F., Lavallee P., Levesque M., Parent A. (2000) Single-axon tracing study of neurons of the external segment of the globus pallidus in primate. *J Comp Neurol* 417:17-31.
- Saura J., Kettler R., Da Prada M., Richards J. G. (1992) Quantitative enzyme radioautography with 3H-Ro 41-1049 and 3H-Ro 19-6327 in vitro: localization and abundance of MAO-A and MAO-B in rat CNS, peripheral organs, and human brain. *J Neurosci* 12:1977-99.
- Schacht U., Leven M., Gerhards H. J., Hunt P., Raynaud J. P. (1982) Recent investigations on the mechanism of action of nomifensine. *Int Pharmacopsychiatry* 17:21-34.
- Schuller J. J., Billings L. M., Marshall J. F. (1999) Dopaminergic modulation of pallidal preproenkephalin mRNA. *Brain Res Mol Brain Res* 69:149-53.
- Schultz W. (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80:1-27.
- Seeman P., Van Tol H. H. (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 15:264-70.
- Segovia J., Tossman U., Herrera-Marschitz M., Garcia-Munoz M., Ungerstedt U. (1986) gamma-Aminobutyric acid release in the globus pallidus in vivo after a 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra of the rat. *Neurosci Lett* 70:364-8.

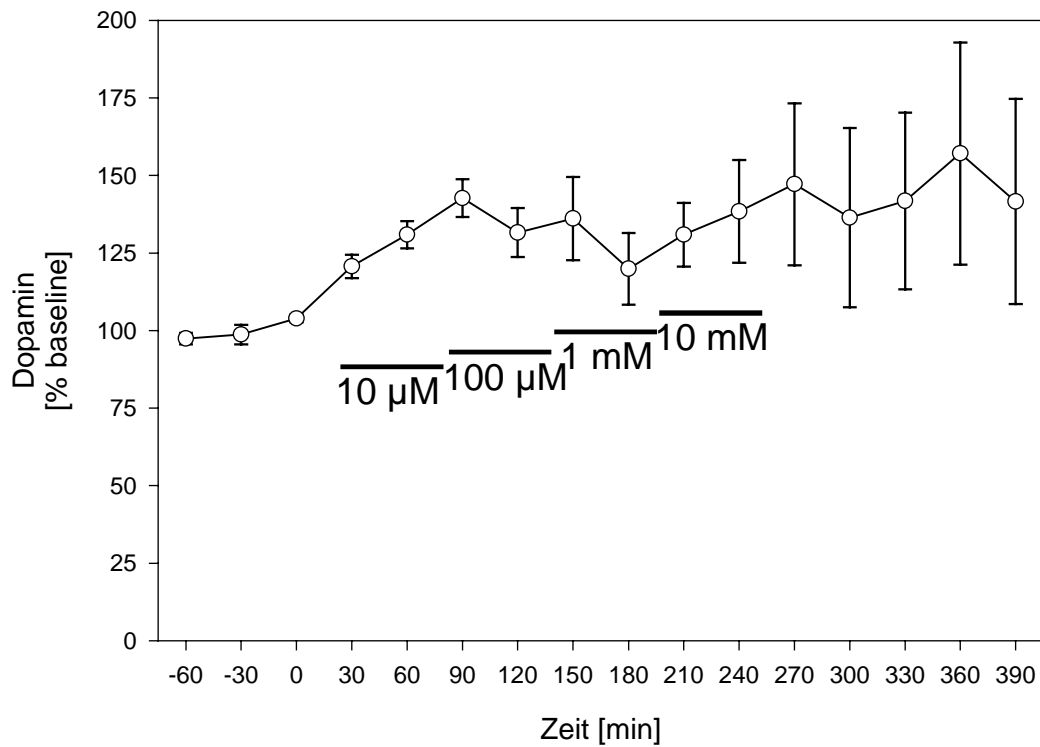
- Sesack S. R., Hawrylak V. A., Matus C., Guido M. A., Levey A. I. (1998) Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J Neurosci* 18:2697-708.
- Shindou T., Koizumi S., Kataoka Y., Watanabe S., Yamamoto K., Nakanishi H. (1992) Inhibitory effect of NMDA on dopaminergic transmission in a slice preparation of rat globus pallidus. *Jpn J Pharmacol* 58:79-82.
- Smeets W. J., Gonzalez A. (2000) Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev* 33:308-79.
- Smith Y., Lavoie B., Dumas J., Parent A. (1989) Evidence for a distinct nigropallidal dopaminergic projection in the squirrel monkey. *Brain Res* 482:381-6.
- Smith Y., Bolam J. P. (1990) The output neurones and the dopaminergic neurones of the substantia nigra receive a GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol* 296:47-64.
- Smith Y., Bolam J. P. (1991) Convergence of synaptic inputs from the striatum and the globus pallidus onto identified nigrocollicular cells in the rat: a double anterograde labelling study. *Neuroscience* 44:45-73.
- Smith Y., Bevan M. D., Shink E., Bolam J. P. (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-87.
- Smith Y., Kieval J. Z. (2000) Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 23:S28-33.
- Stanford I. M., Cooper A. J. (1999) Presynaptic mu and delta opioid receptor modulation of GABAA IPSCs in the rat globus pallidus in vitro. *J Neurosci* 19:4796-803.
- Strange P. G. (2000) Dopamine Receptors. *Tocris Reviews* (published by Tocris Cookson, Editor: Manley S.) 15.
- Suaud-Chagny M. F., Chergui K., Chouvet G., Gonon F. (1992) Relationship between dopamine release in the rat nucleus accumbens and the discharge activity of dopaminergic neurons during local in vivo application of amino acids in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 49:63-72.
- Sulzer D., Chen T. K., Lau Y. Y., Kristensen H., Rayport S., Ewing A. (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci* 15:4102-8.
- Terman D., Rubin J. E., Yew A. C., Wilson C. J. (2002) Activity patterns in a model for the subthalamopallidal network of the basal ganglia. *J Neurosci* 22:2963-76.
- Ungerstedt U., Pycock C. (1974) Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bull Schweiz Akad Med Wiss* 30:44-55.
- Usiello A., Baik J. H., Rouge-Pont F., Picetti R., Dierich A., LeMeur M., Piazza P. V., Borrelli E. (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408:199-203.
- Vallone D., Picetti R., Borrelli E. (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Behavioural Reviews* 24:125-132.
- Vogelsang P. (2002) Immunhistochemische Untersuchungen zur Rolle von Acetylcholin im Globus pallidus und der Substantia innominata der Ratte. Studienarbeit, Abteilung Tierphysiologie des Biologischen Institutes, Universität Stuttgart .
- Weiner D. M., Levey A. I., Sunahara R. K., Niznik H. B., O'Dowd B. F., Seeman P., Brann M. R. (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1859-63.
- Westerink B. H., Kawahara Y., De Boer P., Geels C., De Vries J. B., Wikstrom H. V., Van Kalker A., Van Vliet B., Kruse C. G., Long S. K. (2001) Antipsychotic drugs classified by their effects on the release of dopamine and noradrenaline in the prefrontal cortex and striatum. *Eur J Pharmacol* 412:127-38.

- Westerink B. H., Tuntler J., Damsma G., Rollema H., de Vries J. B. (1987) The use of tetrodotoxin for the characterization of drug-enhanced dopamine release in conscious rats studied by brain dialysis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336:502-7.
- Wichmann T., DeLong M. R. (1996) Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 6:751-8.
- Wichmann T., DeLong M. R. (1999) Oscillations in the basal ganglia. *Nature* 400:621-2.
- Yung K. K., Bolam J. P., Smith A. D., Hersch S. M., Ciliax B. J., Levey A. I. (1995) Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* 65:709-30.
- Zaborszky L., Cullinan W. E. (1996) Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. I. Dopamine-beta-hydroxylase- and tyrosine hydroxylase input to cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 374:535-54.
- Zaborszky L., Duque A. (2000) Local synaptic connections of basal forebrain neurons. *Behav Brain Res* 115:143-58.
- Zetterstrom T., Sharp T., Collin A. K., Ungerstedt U. (1988) In vivo measurement of extracellular dopamine and DOPAC in rat striatum after various dopamine-releasing drugs; implications for the origin of extracellular DOPAC. *Eur J Pharmacol* 148:327-34.
- Zoli M., Torri C., Ferrari R., Jansson A., Zini I., Fuxe K., Agnati L. F. (1998) The emergence of the volume transmission concept. *Brain Res Brain Res Rev* 26:136-47.

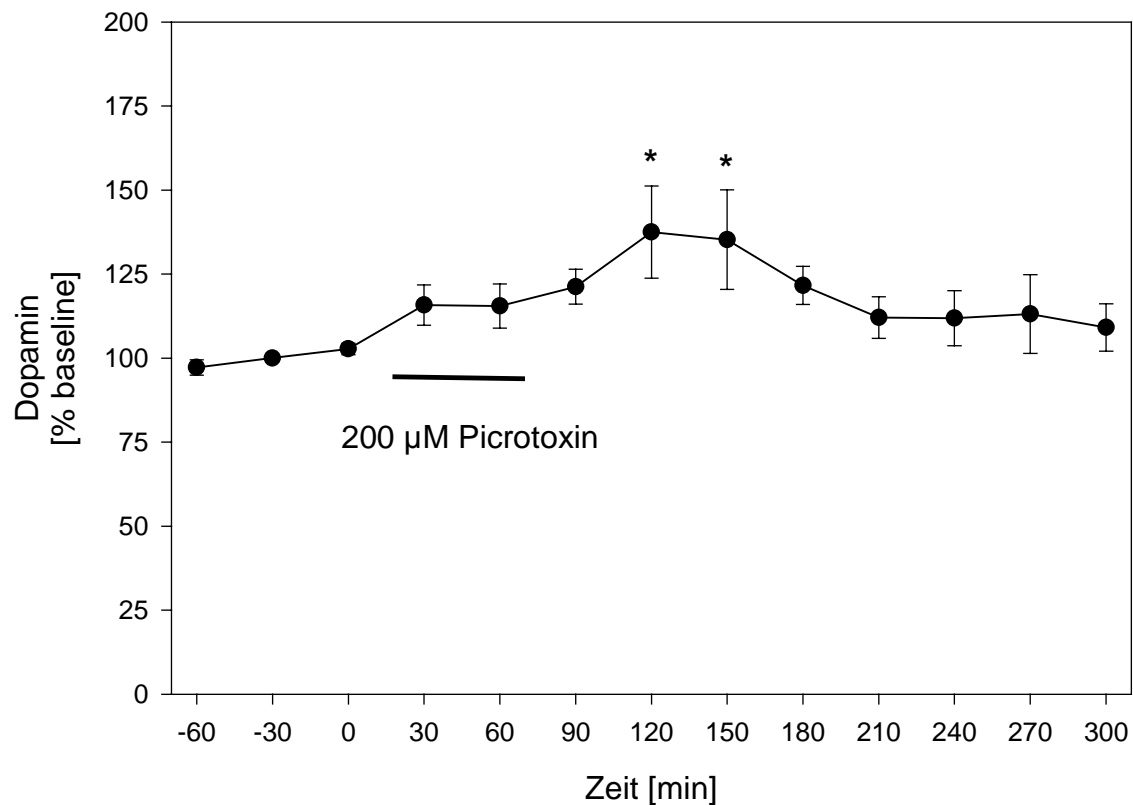
## 8. Anhang



**Abb. 14:** Einfluss des Zeitpunktes des Sondeneinsetzens auf den Verlauf der basalen Dopamin-Konzentrationen im Dialysat (Mittelwert  $\pm$  SEM). Mikrodialysebedingungen entsprechen den in 5.4 beschriebenen, wobei sich der Zeitpunkt des Sondeneinsetzens unterscheidet. Im ersten Fall (N=7, offene Kreise) wurde die Sonde am Abend vor dem Experimentiertag eingesetzt und über Nacht ohne Nomifensin und ab Sample 1 dann mit 3  $\mu$ M Nomifensin perfundiert. Die zweite Kurve (N=7, gefüllte Kreise) zeigt den Verlauf nach akutem Sondeneinsetzen, d.h. die Sonde wurde am Experimentiertag eingesetzt und mit 3  $\mu$ M Nomifensin in der aCSF perfundiert. Als Referenz (100%) wurde in Kurve I der Mittelwert der letzten drei Messwerte, in Kurve II der Mittelwert der ersten drei Messwerte verwendet. Die zeitliche Zuordnung wurde so gewählt, dass in beiden Kurven die Gesamtzeit der Perfusion mit Nomifensin zum jeweiligen Zeitpunkt gleich ist, d.h. Sample 2 wäre das erste Sample nach Sondeneinsetzen für Kurve II. Diese Dialysatfraktionen wurden aus experimentellen Gründen nicht ausgewertet. Ein weiterer Verlauf von Kurve I kann ebenfalls nicht gezeigt werden, da nach den dargestellten Messpunkten die pharmakologische Manipulation erfolgte.



**Abb. 15:** Effekt reverser Mikrodialyse von Carbachol auf die relativen Dialysat-Dopamin-Konzentrationen im GP. Die Mikrodialysebedingungen entsprechen den unter 5.2 beschriebenen. ANOVA für Messwiederholungen zeigte keine signifikanten Änderungen im Gesamtverlauf ( $p=0,63$ ,  $N=6$ ).



**Abb. 16:** Effekt reverser Mikrodialyse von Picrotoxin (200 µM für 60 min) auf die relativen Dialysat-Dopamin-Konzentrationen im GP. Mikrodialysebedingungen wie in Hauber und Fuchs (2000), jedoch mit 1,2 statt 2,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 statt 30 µM Nomifensin in der aCSF und einem Fluss von 2,0 statt 2,5 µl/min. Das Einsetzen der Sonde erfolgte am Abend vor dem Experiment und die Sonde wurde über Nacht nomifensinfrei perfundiert. Etwa 10 h nach dem Sondeneinsetzen wurde der CSF Nomifensin zugegeben und nach dem Erreichen stabiler Dopamin- und Metaboliten-Konzentrationen im Dialysat mit der Messung begonnen. \*  $p < 0,05$  (ANOVA für Messwiederholungen gefolgt von Dunnett's Test mit T=0 min als Referenzwert, N=5).

## 9. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hauber möchte ich mich für die hervorragende Betreuung der Arbeit bedanken. Gerade im ersten Abschnitt der experimentellen Arbeit, geprägt von methodischen Schwierigkeiten, war die ständige Erreichbarkeit und stetige Bereitschaft, aktuelle Fragen und Probleme zu besprechen, Grundvoraussetzung, damit ich mich nicht auf völlig verlorenem Posten fühlte.

Ganz herzlich danken möchte ich Angeline Votteler und Stefan Nitschke für die motivierte und motivierende technische Unterstützung und Mitarbeit. Ohne nun Lobshymnen anzustimmen, möchte ich es auf einen knappen Satz bringen:

Es hat einfach Spaß gemacht, mit Euch zusammenzuarbeiten !

(Eine kleine Strophe sei mir aber doch gestattet: Bei Stefan Nitschke möchte ich mich für die Rechner-Betreuung über all die Jahre bedanken. Welche Lücke seit seinem beruflichen Wechsel entstanden ist, musste ich immer wieder bitter erfahren. Bei dem ein oder anderen hartnäckigen Computer-Problem, das für mich unlösbar war, rettete er meinen Rechner vor dem Exitus.)

Fast die gesamte Zeit der experimentellen Arbeit durfte ich mir mit Dipl.-Biol. t.o. Jens Nagel ein Arbeitszimmer teilen. Trotz unserer enormen Differenzen (unsere Temperatur-Optima liegen in weit entfernten Bereichen der Celsius-Skala) war eine friedliche Co-Existenz im gleichen Raum möglich. Da wir beide mit der Mikrodialyse und HPLC arbeiteten, plagten uns die gleichen Probleme, so dass der ein oder andere Lösungsansatz nach einem gegenseitigen "Leid-Klagen" zustande kam. Darüber hinaus waren Arbeitsrhythmus synchron und Ordnungsliebe gleich stark ausgeprägt, was eine erfolgreiche Zusammenarbeit auch in den gemeinsam genutzten Labors ermöglichte. Für die Kollegialität, Hilfsbereitschaft und Freundschaft: Danke !

Derselbe Dank geht auch an Dr. Andreas Kalkowski, der neben Jens Nagel Dritter im Bunde bei abendlichen Pasta-Runden bei weit in die Dunkelphase reichenden Experimenten war. Als Organisationstalent mit technischem Geschick verdanke ich ihm etliche Tipps - nur vom immer wieder auftauchenden Vorschlag "Sprengen" habe ich bis heute Abstand genommen ...

Nachdem Jens Nagel die Abteilung als aktiver Mitarbeiter verlassen hatte, wurde dessen Platz im Arbeitszimmer von Caroline Graff eingenommen. Eine sympathischere "Nachfolgerin" als Co-Doktorandin, die sich zudem durch hohe fachliche Kompetenz hervorhebt, hätte ich mir kaum wünschen können. Merçi Caroline !

Petra Vogelsang danke ich für die Durchführung ihrer Studienarbeit, die in thematischem Zusammenhang mit dieser Arbeit stand.

Bei Frau Prof. Dr. Franziska Wollnik möchte ich mich für die Begutachtung der Arbeit sowie für das Schaffen der guten Arbeitsvoraussetzungen in der Abteilung Tierphysiologie bedanken.

Ein großes Dankeschön an Beate Rehkopf und Dagmar Mvondo für die "nachbarschaftliche Hilfe" bei Laborbedarf und Chemikalien und für die freundschaftliche Kollegialität. Letzterer Dank geht auch an Dipl.-Biol. t.o. Marie-Louise Rütz und Dipl.-Biol. t.o. Claudia Zappe.

Bei PD Dr. Beate D. Kretschmer, Dr. Vera Pedersen und besonders auch Ulli Ruess, (ehemalige) Mitarbeiter der Abteilung Neuropharmakologie der Universität Tübingen möchte ich mich für die methodische Unterstützung bei der Mikrodialyse, HPLC und Immunhistochemie bedanken.

Thanks to Dr. Matthijs Feenstra (Netherlands Institute for Brain Research) for the kind invitation to visit his lab in Amsterdam and technical support !

Frau Dr. Karla Drescher (Abbott, Ludwigshafen) und Herr Norbert Wenkel (Firma Axel Semrau, Sprockhövel) haben mir durch die Leihgabe von technischem Gerät einige lange Nächte erspart, da es mir dadurch möglich war, einen weiteren Mikrodialyseaufbau parallel zu betreiben. Dafür herzlichen Dank.

Herrn Meng von der Firma UB Snack foods GmbH (Donauwörth) möchte ich für die Zusendung von Fonzie® danken.

Für die finanzielle Förderung des Projektes bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem deutschen Steuerzahler.

Diese Dissertation schließt eine langjährige schulische und universitäre Ausbildung ab, während der mich meine Eltern immer unterstützt und gefördert haben - und das nicht nur in materieller Hinsicht. Dieser Rückhalt wurde gerade in den letzten eineinhalb Jahren besonders wichtig. Dafür ein ganz tief empfundenen Danke !

Einen Grundstock für meine Ausbildung verdanke ich mit Sicherheit meinem verstorbenen Großvater Gregor Bergold, der meine kindliche Neugier mit schier unendlicher Geduld im Fragen-Beantworten förderte.

Last but not least geht ein Riesen-Dank an Dich, Renate. Was Du in den letzten eineinhalb Jahren geleistet hast, ist weitaus größer als diese Arbeit.



## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Holger Fuchs  
Geburtsdatum: 24. März 1973  
Geburtsort: Offenburg  
Eltern: Werner und Rita Fuchs  
Kinder: ein Sohn  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1979-1983 Besuch der Geschwister-Scholl-Grundschule in Gengenbach  
1983-1992 Besuch des Gymnasiums in Gengenbach  
Mai 1992 Abschluss: Abitur

### Zivildienst

Juli 1992 – Oktober 1993 Zivildienstleistender beim Malteser-Hilfsdienst in Offenburg

### Studium

Oktober 1993 – Juni 1999 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart  
Juni 1999 Abschluss: Diplom-Biologe technisch orientiert  
seit September 1999 Wissenschaftlicher Angestellter am Biologischen Institut, Abteilung Tierphysiologie, der Universität Stuttgart und Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit

Diese Arbeit wurde von mir selbständig verfasst.

Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Alle Co-Autoren der zur Veröffentlichung eingereichten Manuskripte sind aufgeführt.

Stuttgart, den 9. September 2002

Holger Fuchs