

Aus der Klinik für Klinische Neurophysiologie
(Prof. Dr. med. W. Paulus)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Bedeutung einer Beeinträchtigung der D₂- und D₃-
vermittelten dopaminergen Transmission für die
motorische Aktivität und das motorische Lernverhalten im
Mausmodell

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kenan Hasan

aus

Wolfsburg

Berlin 2015

DEKAN: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Liebetanz

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. André Fischer

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Rainer Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Dopaminsystem.....	1
1.1.1 Bedeutung des Dopaminsystems für das menschliche Nervensystem.....	1
1.1.2 Überblick über die Dopaminrezeptoren.....	3
1.2 Dopamin und Lernen.....	5
1.3 Dopamin und motorisches Lernen.....	6
1.4 Eisen und Dopamin.....	7
1.5 Ziele der vorliegenden Untersuchungen.....	9
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Versuchstiere.....	11
2.2 Laufrad-basierte Analyse motorischer Aktivität und motorischen Lernens.....	11
2.3 Spezieller Versuchsaufbau.....	13
2.3.1 D ₂ : Beeinträchtigung des Laufverhaltens durch D ₂ -Rezeptordefizienz (D ₂ ^{-/-}) und durch pharmakologische Blockade des D ₂ -Rezeptors mittels Raclopridinjektionen.....	13
2.3.2 D ₃ : Einfluss von Eisenmangel und D ₃ -Rezeptordefizienz (D ₃ ^{-/-}) auf das motorische Lernverhalten.....	14
2.4 Statistik.....	15
3. Ergebnisse.....	16
3.1 Einfluss des D ₂ -Rezeptors auf das Laufverhalten.....	16
3.1.1 D ₂ -Rezeptordefizienz (D ₂ ^{-/-}) führt zu starker Einschränkung der motorischen Aktivität im Laufrad.....	16
3.1.2 Raclopridinjektionen vor Beginn der Aktivitätsphase bewirken dosisabhängige reversible Verschiebungen des nächtlichen Aktivitätsprofils.....	17
3.2 Versuchstiere mit Eisendefizienz zeigen geringere Dist _{24h} und Trun unabhängig vom D ₃ -Rezeptorstatus. Versuchstiere mit Eisendefizienz und negativem D ₃ -Rezeptorstatus zeigen geringere V _{max} und V _{max} % in der Lernphase.....	24
4. Diskussion.....	28
4.1 Auswirkungen einer Beeinträchtigung der D ₂ -Rezeptoraktivität auf die motorische Aktivität im normalen Laufrad.....	28
4.1.1 D ₂ -Rezeptordefizienz führt zu einer deutlichen Einschränkung der motorischen Aktivität.....	28
4.1.2 Pharmakologische Blockade des D ₂ -Rezeptors durch Racloprid führt zu einer Verschiebung der Aktivitätsmaxima in der Aktivitätsphase	29
4.2 Auswirkungen einer diätetischen Beeinflussung des Dopaminstoffwechsels durch Eisenmangel auf die motorische Aktivität im KLR.....	31

4.3 Versuchstiere mit D ₃ -Defizienz und induziertem Eisenmangel zeigten verzögertes Lernen im komplexen Laufrad.....	33
5. Zusammenfassung.....	36
6. Publikationen.....	37
7. Anhang.....	38
7.1 Tabellenverzeichnis.....	38
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	38
7.3 Tabellarische Zusammenstellung der Posthoc-t-Tests des Kapitels 3.1.2.....	39
7.3.1 Intraperitoneale Applikationen.....	39
7.3.2 Subkutane Applikationen.....	40
8. Literaturverzeichnis.....	41

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom
cAMP	zyklisches Adenosylmonophosphat
D _x R	Dopaminrezeptor _x
D _x ^{-/-}	Dopaminrezeptor _x knockout
D _x ^{+/+}	Wildtyp in Bezug auf den Dopaminrezeptor _x
DAT	Dopamintransporter
Dist _h	gesamte zurückgelegte Strecke pro Stunde
Dist _{24h}	gesamte zurückgelegte Strecke pro 24-Stunden-Intervall
Dist _{mean}	mittlere Distanz eines Laufes
Dist _{sum} %	prozentualer Anteil der bis zu einem Zeitpunkt zurückgelegten Strecke an der gesamten Strecke dieses 24-Stunden-Intervalls
ID	eisenreduzierte Diät
IP	intraperitoneal
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
KLR	komplexes Laufrad
LTP	Long-Term-Potentiation
MOSS	Motor-Skill-Sequence
ND	normale Diät
NaCl	Natriumchlorid
NLR	normales Laufrad
N _{run}	Anzahl der Läufe pro 24-Stunden-Intervall
RCP	Racloprid
SC	subkutan
T _{mean}	mittlere Dauer eines Laufes
T _{run}	gesamte Zeit im Laufrad pro 24-Stunden-Intervall
V _{max}	maximale Geschwindigkeit
V _{max} %	relative maximale Geschwindigkeit eines 24-Stunden-Intervalls in Bezug auf die maximale im KLR erreichte Geschwindigkeit
VTA	Ventrales tegmentales Areal
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Dopaminsystem

1.1.1 Bedeutung des Dopaminsystems für das menschliche Nervensystem

Die bedeutende Rolle des Neurotransmitters Dopamin und seiner Rezeptoren im zentralen Nervensystem des menschlichen Organismus ist seit Jahren Gegenstand der Forschung. Erstmals wurde eine Beeinträchtigung des Dopaminstoffwechsels als Ursache einer Pathologie in den 60er Jahren von Carlsson und Lindqvist (1963) beschrieben. Sie stellten daraufhin die Dopaminhypothese als Grundlage der Schizophrenietherapie auf. Auch der Zusammenhang zwischen dem Dopaminstoffwechsel und dem Morbus Parkinson wurde bereits in den sechziger Jahren beschrieben (Barbeau et al. 1963). Heutzutage werden zahlreiche Pathologien mit einer Störung des Dopaminstoffwechsels in Verbindung gebracht. Neben der paranoiden Schizophrenie und dem Morbus Parkinson wurden auch bei Anorexia nervosa (Adan et al. 2011), ADHS (Volkow et al. 2007), Suchterkrankungen (Dackis und Gold 1985) und der emotional instabilen Persönlichkeitsstörung vom Borderline-Typus (Bandelow et al. 2010) sowie dem Placeboeffekt (de la Fuente-Fernández und Stoessl 2002) Veränderungen im Dopaminsystem nachgewiesen.

Vier große axonale Bahnsysteme sind beschrieben, die mit Dopamin als Transmitter in verschiedene Bezirke des zentralen Nervensystems projizieren (Vallone et al. 2000):

1. das nigrostriatale System
2. das mesolimbische System
3. das mesokortikale System
4. das tuberoinfundibuläre System

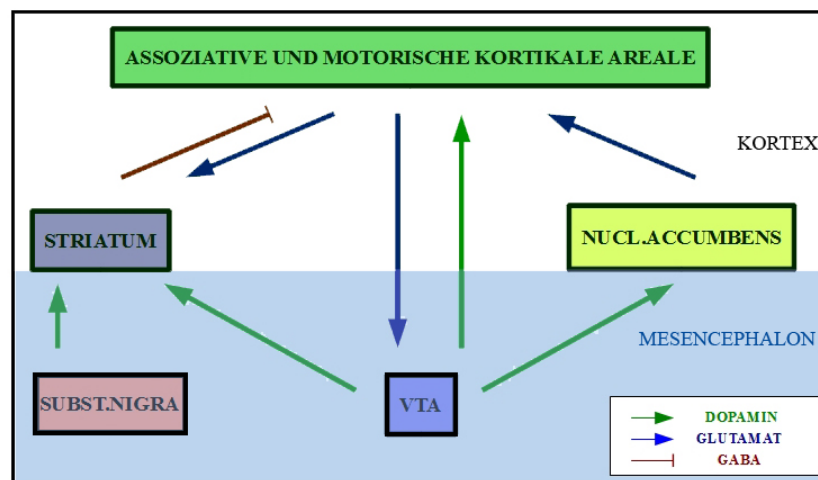
Die nigrostriatalen Bahnen vermitteln hauptsächlich Signale von der Pars compacta der Substantia nigra zum Striatum und modulieren so die Motorik. Eine Degeneration dieser Bahnen führt zum klinischen Bild des Morbus Parkinsons mit den Symptomen Rigor, Tremor und Akinese (Gerfen 1992; Lang und Lozano 1998).

Die Bahnen des mesokortikalen Systems verlaufen vom ventralen tegmental Areal (VTA) in die verschiedenen Areale der Großhirnrinde und beeinflussen das Lernen, die Gedäch-

nisfunktionen und weitere kognitive Funktionen (Le Moal und Simon 1991; Laszy et al. 2004). Motivation und Belohnungsverhalten werden mit dem mesolimbischen System in Verbindung gebracht (Wise 2004). Es projiziert über das VTA auf die olfaktorischen Tuberkel, den Nucleus accumbens und auf verschiedene Gebieten des limbischen Systems (Vallone et al. 2000).

Dopamin ist damit ein zentraler Botenstoff für die Kommunikation zwischen Hirnstammstrukturen, dem limbischen System, den Basalganglien und dem Kortex. Die Verknüpfung der genannten Strukturen ist für das Erlernen neuer motorischer Abläufe entscheidend. Das komplexe Zusammenwirken von Motivation über die mesolimbischen Bahnen, der korrekten Ausführung durch die extrapyramidal-motorischen nigrostriatalen Bahnen und der Verarbeitung und Speicherung von erlernten Bewegungen über die mesokortikalen Bahnen ist die Grundlage für das motorische Lernen (Alexander et al. 1986; Le Moal und Simon 1991; Vallone et al. 2000; Beck und Beckmann 2009). Das dopaminerge System interagiert dabei mit glutamatergen und GABAergen Strukturen (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des dopaminergen Zusammenwirkens beim motorischen Lernen



Das Zusammenwirken der mesolimbischen, der mesokortikalen Bahn und der extrapyramidalen Motorik ermöglicht motorisches Lernen. Das VTA ist dabei die zentrale Schaltstelle zwischen dem Striatum, dem Nucleus accumbens (Limbisches System) und dem Hippocampus (Kortex).

1.1.2 Überblick über die Dopaminrezeptoren

Dopaminrezeptoren gehören zu der Gruppe der metabotropen Rezeptoren, die als Siebentransmembrandomänen-Rezeptoren G-Protein-gekoppelt ihre Funktion erfüllen. Bis heute geht man von fünf verschiedenen Dopaminrezeptoren, die von D_1 bis D_5 benannt sind (Civelli et al. 1993). Keibian (1992) teilte die Dopaminrezeptoren in zwei Gruppen ein, abhängig davon, ob sie einen stimulierenden oder inhibierenden Effekt auf die Adenylatzyklase haben. Dopamin bewirkt bei Rezeptoren der D_1 -ähnlichen Gruppe (bestehend aus dem D_1 und dem D_5 -Rezeptor) eine Aktivierung der Adenylatzyklase und damit eine Erhöhung der cAMP-Spiegel. Dieses bedingt eine Stimulierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A, die durch Phosphorylierung bestimmter Proteine zu einer spezifischen Reaktion führt (Girault und Greengard 2004). Bei der D_2 -ähnlichen Gruppe, bestehend aus den D_2 -, D_3 - und D_4 -Rezeptoren bewirkt Dopamin über eine Inhibition der Adenylatzyklase eine Senkung des cAMP-Spiegels und damit eine Hemmung der Signalkaskade (Girault und Greengard 2004).

Dopaminerge Neuronen und ihre Rezeptoren finden sich im gesamten ZNS, wobei die Häufigkeit des Vorkommens abhängig vom Subtyp und der Region stark divergiert (siehe Tabelle 1). D_1 - und D_2 -Rezeptoren kommen zusammen in größerer Dichte vor allem im Neokortex sowie in den Basalganglien mit Nucleus caudatus, Putamen und Nucleus accumbens vor (Xu et al. 1997). In diesen Strukturen wirken D_1 - und D_2 -Rezeptoren auf molekularer Ebene antagonistisch, physiologisch können sie aber, z.B. durch Sensibilisierung von D_2 -Rezeptoren nach Stimulation von D_1 -Rezeptoren auch synergistisch wirken (Hu und White 1992, 1994; Girault und Greengard 2004). Le Moine und Bloch (1995) gehen von einem Synergismus auch auf Zellebene aus. Im Gegensatz zur klassischen Lehrmeinung vermuteten sie eine Co-Lokalisation von D_1 - und D_2 -Rezeptoren an einer Synapse. Über D_2 -Rezeptoren wird vor allem auf die inhibitorischen GABAergen Neurone im Striatum, zum Teil aber auch auf die olfaktorischen Tuberkel sowie den Nucleus accumbens projiziert (Bouthenet et al. 1991).

D_2 -Rezeptoren finden sich in großer Menge vor allem postsynaptisch im gesamten Gehirn. D_3 -Rezeptoren finden sich gehäuft im limbischen System (Landwehrmeyer et al. 1993), vor allem am Nucleus accumbens, den olfaktorischen Tuberkeln und den Inseln von Calleja (Lévesque et al. 1992). Bouthenet et al. (1991) fanden den D_3 -Rezeptor aber auch in minimaler Dichte im Hippocampus, in den septalen Regionen und in vielen kortikalen Arealen.

Die Dichte der D₃-Rezeptoren an einer Lokalisation ist im Vergleich zu D₂-Rezeptoren generell geringer (Millan et al. 2004).

Der D₄-Rezeptor ist ebenfalls nur in geringer Dichte im zentralen Nervensystem vorhanden. Größere Ansammlungen finden sich im frontalen Kortex, der Amygdala, dem Hippocampus, dem Hypothalamus und dem Mesenzephalon (Onali et al. 1981; Van Tol et al. 1991).

Der zur D₁-Gruppe gehörende D₅-Rezeptor ist im Vergleich zum D₁-Rezeptor deutlich seltener und findet sich bei Primaten vor allem im zerebralen Kortex, dem lateralen Thalamus und dem Striatum (Huntley et al. 1992; Choi et al. 1995).

Tabelle 1: Überblick über die häufigste Lokalisation der D₁- bis D₅-Rezeptoren (Missale et al. 1998)

Rezeptortyp	Anatomische Lokalisation
D ₁	- Nucleus accumbens - Neostriatum - Inseln von Calleja Kern und Hülle
D ₂	- Nucleus accumbens - Neostriatum - Substantia nigra - Ventrales tegmentales Areal Kern, septaler Pol der Hülle Pars compacta
D ₃	- Nucleus accumbens - Inseln von Calleja - Cerebellum - Substantia nigra - Ventrales tegmentales Areal - Hippocampus Ventromediale Hülle Lobuli 9, 10 CA1,CA2,CA3,CA4, Gyrus dentatus
D ₄	- Frontaler Kortex - Hippocampus - Cerebellum CA1,CA2,CA3,CA4, Gyrus dentatus
D ₅	- Hippocampus - Parafaszikulärer Nucleus CA1,CA2,CA3,CA4, Gyrus dentatus

1.2 Dopamin und Lernen

„That of course raises the fascinating question of what dopamine really does [...]“ (Berridge 2000, S.182). Diese Frage stellte sich der Psychologe K.C. Berridge, nachdem die neurophysiologische Forschung seit dem Nachweis des Neurotransmitters Dopamin im Jahr 1967 seine Bedeutungen für die Vorgänge im ZNS sucht. Zunächst wurde aufgrund der bedeutsamen Fortschritte der Therapie des Morbus Parkinson mit Levodopa (Schwartz et al. 1972) Dopamin fast ausschließlich als motorischer Transmitter im ZNS betrachtet. Erst 1982 wurden die kognitiven Defizite bei Parkinsonpatienten beschrieben und Dopamin mit Lernen und Kognition in Verbindung gebracht (Mortimer et al. 1982; Pirozzolo et al. 1982). Seitdem wurde vor allem mithilfe klassischer Lernmodelle wie der operanten und instrumentellen Konditionierung die Bedeutung des Dopamins für das Lernen erforscht. Die neuropsychologische Dopaminforschung stellte daraufhin die *Liking*- und die *Wanting*-Hypothese auf. Die *Liking*-Hypothese besagt, dass Dopaminantagonisten die Freude an Belohnungen inhibieren und damit Lernprozesse verzögern (Wise 2004). Berridge (2000) modifizierte diese Hypothese, als er nachwies, dass bei Ratten durch medikamentöse Blockade der Dopaminrezeptoren der Antriebe, eine Belohnung zu erlangen, reduziert war. Wurden sie jedoch zum Trinken einer süßen Lösung gezwungen, so zeigten die Versuchstiere Zeichen eines Wohlempfindens. Daraus schloss Berridge (2000), dass die Dopaminblockade die Empfindung des Glückseins nicht beeinträchtigt, der Antriebe, es zu wollen (*Wanting*) jedoch reduziert ist (Calaminus 2010). Weiterhin konnten Schultz et al. (1997) verdeutlichen, dass Dopamin bei der klassischen Konditionierung eine bedeutsame Rolle spielt. Dabei wird ein unspezifischer neutraler Reiz durch die Kopplung mit einer Belohnung zu einem konditionierten Reiz, der eine Erwartungshaltung bedingt. Zunächst konnte eine Aktivitätssteigerung dopaminergener Neurone nur bei Belohnungsgabe nachgewiesen werden, später erfolgte jedoch die Aktivitätssteigerung schon beim Stimulus. Erhielten die Versuchstiere daraufhin keine Belohnung, so verringerte sich die Aktivität der dopaminergen Neurone. Aus diesen Ergebnissen leiteten Schultz et al. (2008) die Vorhersagetheorie ab, nach der die Ausschüttung von Dopamin vorhersagt, wie wahrscheinlich eine Belohnung auf einen Stimulus folgt.

1.3 Dopamin und motorisches Lernen

Das Erlernen neuer motorischer Fähigkeiten setzt das Zusammenwirken verschiedener Systeme des ZNS voraus. Dabei sind die Initialphase und die Konsolidierungsphase zu unterscheiden, bei denen die dopaminergen Strukturen eine essentielle Rolle spielen.

In der Initialphase werden in erster Linie neue Bewegungsabläufe koordiniert. In dieser Frühphase des motorischen Lernens steht vor allem die Aktivität der kortiko-zerebellären und der kortiko-striatalen Schleife im Vordergrund (Ashe et al. 2006; Orban et al. 2010). Costa et al. (2004) beschrieben im Tierversuch mit Mäusen, dass wiederholte Aktivierung dieser Bahnen zu Plastizitätsvorgängen im Striatum führt. Die Konsolidierung des Erlernten erfolgt dann durch die Vernetzung und Übertragung auf kortikale Bezirke wie den präfrontalen Kortex und weiterer motorischer Areale (Fischer et al. 2005). Walker et al. (2003) konnten im Humanexperiment feststellen, dass die Konsolidierung trainierter Inhalte während des Schlafens stattfindet. Modulierende Effekte auf die Konsolidierung haben das ventrale tegmentale Areal (VTA) und der Hippocampus. Aktivitäten im VTA führen über dopaminerge Neurone zur Stimulation des Hippocampus und bei Wiederholung zu einer Steigerung der Langzeit-Potenzierung an hippocampalen Synapsen (Lisman und Grace 2005). Der Hippocampus übernimmt somit die Funktion einer ersten Konsolidierung, dem sogenannten schnellen Lernen (Beck und Beckmann 2010). Erst die langfristige dopaminerge Stimulierung des aktivierten Hippocampus führt zur endgültigen Konsolidierung des neuen Bewegungsablaufes im Neokortex (Beck und Beckmann 2010). Der Hippocampus reguliert demnach dopaminabhängig, welche Informationen im Langzeitgedächtnis gespeichert werden. Auch diese Plastizitätsvorgänge geschehen während der Schlafphase, nicht während der Aktivitätsphase (Walker et al. 2003). Vor allem unerwartete Erfolge im Erlernen von Bewegungsabläufen führen zu erhöhter Freisetzung von Dopamin im Striatum und Hippocampus und dadurch zu den genannten Plastizitätsvorgängen (Beck und Beckmann 2009). Zusammenfassend hat der Transmitter Dopamin eine essentielle Rolle für das motorische Lernen, da es über neuroplastische Vorgänge im Striatum, Hippocampus und dem Neokortex am Erlernen neuer Bewegungsabläufe beteiligt ist. Diese komplexen Vorgänge beruhen auf der koordinierten Stimulation und Inhibition dopaminergener Neurone.

1.4 Eisen und Dopamin

Eisenmangel gilt als eine der häufigsten Fehlernährungen und betrifft nach UN-Berichten mehr als vier Milliarden Menschen weltweit (United Nations 2004). Die Folgen jener Fehlernährung sind gut untersucht und spiegeln sich vor allem im hämatopoetischen System als Anämie wider. Eisenmangel hat aber abhängig von der Dauer des Mangels auch unabhängig vom hämatopoetischen System einen negativen Effekt auf kognitive Funktionen (Beard 2001).

Studien bei Erwachsenen und Kindern zufolge ist Eisenmangel mit kognitiven Symptomen wie Apathie, Lethargie und mangelnder Aufmerksamkeit assoziiert (Pollitt 1993; Walter 2003). Aukett und Mitarbeiter (1986) und Idjradinata und Pollitt (1993) wiesen nach, dass Kinder mit Eisenmangelanämie in Skalen zur Beurteilung von kognitiven Fähigkeiten und motorischem Lernen schwächere Ergebnisse erzielten als Kinder mit normalen Eisenwerten. Es konnten auch Unterschiede in der schulischen Leistung zwischen anämischen Schulkindern und nicht-anämischen nachgewiesen werden (Lozoff et al. 1987, 2006).

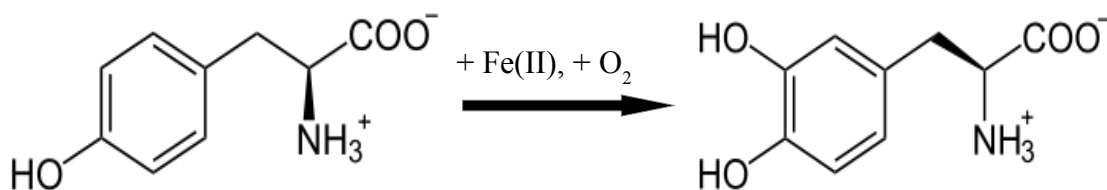
Die Gründe für diese Unterschiede sind vielschichtig. Auf Verhaltensebene zeigen Kinder in Mangelsituationen, insbesondere mit Anämie, eine reduzierte Bereitschaft, sich zu bewegen und die Umgebung zu explorieren und haben dadurch weniger die Möglichkeit, Neues zu erlernen (Grantham-McGregor und Ani 2001). Rao und Mitarbeiter (2003), Erikson (2001) und Beard und Mitarbeiter (2003) konnten zudem bei Ratten nachweisen, dass perinatale Eisendefizienz bereits frühzeitig zu einer eingeschränkten Myelinisierung und Nervenzellausreifung im für Lernprozesse wichtigen Hippocampus führt.

Eine Interaktion zwischen verändertem Eisenstoffwechsel und Dopaminstoffwechsel wurde erstmals von Youdim et al. (1983) beschrieben. Die von der Tyrosinhydroxylase katalysierte Reaktion hydroxyliert L-Tyrosin zu L-DOPA (Nagatsu et al. 1964) (siehe Abbildung 2). Diese Reaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthese aller Monoamine. L-Dopa wird in einem weiteren Schritt durch die L-Dopa-Decarboxylase zu Dopamin decarboxyliert. Die Tyrosinhydroxylase benötigt als Koenzym neben dem Redoxpaar 7,8-Dihydrobiopterin – 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin auch das essentielle Spurenelement Eisen (Nagatsu et al. 1964).

Erikson und Mitarbeiter (2000) und Beard und Mitarbeiter (2003) konnten im Tierversuch an Ratten darlegen, dass eisendefiziente Tiere einen veränderten Dopaminstoffwechsel vorwiesen, der auf eine Abnahme der D₁- und D₂-Rezeptoraktivität sowie auf einer Reduktion

der membranständigen Dopamintransporter (DAT) als Folge des Eisenmangels beruhte. Der DAT transportiert im physiologischen Zustand Dopamin aus dem synaptischen Spalt zurück ins intrazelluläre Zytoplasma und beendet damit das Dopaminsignal (Zapata et al. 2007). Die verminderte Zahl membranständiger DAT bei Eisenmangel ist auf eine veränderte Interaktion zwischen Rezeptoren der D₂-Gruppe und dem Transporter zurückzuführen (Meiergerd et al. 1993). Dickinson und Mitarbeiter (2002) konnten in diesem Zusammenhang herausarbeiten, dass die vermehrte agonistische Bindung am D₂-Rezeptor zu einer Hochregulierung des DAT führt, eine antagonistische zu einer Herunterregulierung und somit zu einem verlängerten Dopaminsignal. Diese Mechanismen wirken im Sinne einer Autoregulation auf das dopaminerge System.

Abbildung 2: Chemische Reaktion von L-Tyrosin zu L-DOPA, der Vorstufe zu Dopamin



Bei der von der Tyrosinhydroxylase katalysierten Reaktion wird Eisen als Koenzym benötigt

1.5 Ziele der vorliegenden Untersuchungen

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit den folgenden drei Fragestellungen:

1. Welche Auswirkungen haben das Fehlen und die Blockade des D₂-Rezeptors auf die motorische Aktivität im Laufradmodell bei Mäusen?
2. Welche Auswirkung hat ein Fehlen des D₃-Rezeptors auf die motorische Aktivität und das motorische Lernen im Laufradmodell bei Mäusen?
3. Welche Auswirkung hat eine Eisenmangel-induzierte Störung des Dopaminsystems auf die motorische Aktivität und das motorische Lernen im Laufradmodell bei Mäusen?

Der D₂-Rezeptor ist der dominierende Rezeptor der D₂-Gruppe im ZNS von Mäusen (Baik et al. 1995). Durch sein häufiges Vorkommen im Striatum, im Nucleus accumbens und dem VTA ist er an dopaminvermittelten kognitiven Vorgängen im ZNS entscheidend beteiligt. D₂-Knockout-Mäuse zeigen eine Hypolokomotion und einen parkinsonoiden Habitus (Baik et al. 1995; Maldonado et al. 1997; Jung et al. 1999).

Aufgrund der zu erwartenden Hypolokomotion ist das von uns verwendete Laufradmodell (Liebetanz und Merkler 2006) zur Beurteilung des motorischen Lernens bei D₂-Knockout-Mäusen ungeeignet, da die verminderte Laufleistung eine vergleichbare Trainingsphase im normalen Laufrad (NLR) und damit eine Vergleichbarkeit zur Kontrollgruppe nicht zulässt (siehe Material und Methoden: Abschnitt 2.2).

In diesem Zusammenhang ist eine kurzfristige pharmakologische Blockade des D₂-Rezeptors interessant, da die Störung der D₂-Rezeptor-Signalwege so nur für einen definierten Zeitraum vorliegt und isolierter und ohne Einfluss von Adaptationsvorgängen beurteilt werden kann.

Der D₃-Rezeptor ist zwar sehr gering im ZNS repräsentiert (Millan et al. 2004), jedoch finden sich die größten Ansammlungen in den entscheidenden Strukturen, die mit Lernen in Verbindung gebracht werden: dem Nucleus accumbens, der VTA und dem Hippocampus (Missale et al. 1998; Vallone et al. 2000) (siehe Tabelle 1). Da in Studien festgestellt wurde, dass die dopaminergen Strukturen im Gehirn sich in Abwesenheit des D₃-Rezeptors normal entwickeln, wurde die Bedeutung des D₃-Rezeptors möglicherweise unterschätzt (Xu et al. 1997). Hier soll daher die Auswirkung einer D₃-Defizienz auf das motorische Lernen im

Laufrad untersucht werden.

Lozoff et al. (1987) beschrieben, dass motorisches Lernen durch Eisenmangel-induzierte Anämie beeinträchtigt wird. In vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine 15-wöchige eisendefiziente Ernährung nicht zu einer Anämie führt (Dowling et al. 2011). Vor diesem Hintergrund soll hier untersucht werden, inwieweit eine eisendefiziente Diät das Laufverhalten im Laufrad und das motorische Lernen unabhängig von einer physischen Beeinträchtigung durch eine Anämie beeinflusst.

Weiterhin soll die Interaktion von D₃-Defizienz und Eisenmangel in Bezug auf das motorische Lernen im Laufradmodell untersucht werden. Für diese Fragestellungen verwendeten wir ein Laufradmodell, das die detaillierte Darstellung von motorischer Aktivität und motorischem Lernen im Mausmodell über einen längeren Zeitraum erlaubt (Liebetanz und Merkle 2006).

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle von uns durchgeführten Versuche entsprechen den Gesetzen der deutschen Tierschutzbehörde und wurden von der Niedersächsischen Regierung geprüft und genehmigt. Die Versuchstiere wurden je nach Versuch in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums gezüchtet oder bei Charles River Laboratories (Sandhoferweg 7, 97633 Sulzfeld, Deutschland) erworben. Wir verwendeten nur männliche Mäuse, um einen Einfluss weiblicher Geschlechtshormone auf das dopaminerge System als Fehlerquelle (Kritzer und Creutz 2008) zu vermeiden. Die Mäuse wurden für die Versuche in Einzelkäfigen untergebracht, um das Laufverhalten jeder Maus individuell zu beurteilen. Sie hatten zu jedem Zeitpunkt freien Zugang zu Futter und Wasser. Den Tag-Nachtzyklus legten wir mit 12 Stunden (7:00-19:00Uhr) fest.

Die Züchtung der D_3 -/-Mäuse erfolgte in der ZTE der Universität Göttingen. Gezüchtet wurden Knockout-Mäuse mit homozygoter D_3 -Defizienz durch Rückkreuzung aus Eltern-tieren ($Drd3^{tm1Dac}$) mit C57Bl6n-Herkunft. Die Bestätigung des Fehlens der D_3 -rezeptorkodierenden Region geschah nach der von Accili und Mitarbeitern (1996) beschriebenen Methode.

2.2 Laufrad-basierte Analyse motorischer Aktivität und motorischen Lernens

Grundlage des verwendeten Laufradmodells ist ein uneingeschränkter Zugang zum Laufrad, der es den Versuchstieren ermöglicht, dem eigenen physiologischen Aktivitätsrhythmus zu folgen. Um dieses zu erreichen, bestückten wir jeden Käfig mit einem Laufrad, das über einen Rotationssensor mit der Laufradachse verbunden wurde. Die Auflösung des Sensors beträgt 1/16 Umdrehung, eine Umdrehung entspricht der Distanz von 0,38 m.

Um sensitiv Defizite im motorischen Lernen nachweisen zu können, nutzten wir die von Liebetanz und Merkler (2006) entwickelte Motor-Skill-Sequence (MOSS). Grundlage dieser Methode sind zwei verschiedene Arten von Laufrädern. Ein konventionelles bzw. normales Laufrad (NLR) mit Speichen in gleichbleibendem Abstand von 0,3 cm sowie ein

komplexes Laufrad (KLR), bei dem in definierter Abfolge einzelne Speichen entfernt werden, was in unterschiedlichen Sprossenabständen zwischen 0,3 cm und 1 cm resultiert. Im Versuchsablauf von MOSS werden 2 Phasen unterschieden. In der ersten Phase haben die Versuchstiere zunächst Zugang zum NLR. Nach 2 - 3 Wochen Training im NLR erreichen die Mäuse ein Plateau mit stabilen Werten für die maximal erreichte Geschwindigkeit (V_{\max}) und die gelaufene Strecke pro 24-Stunden-Intervall ($\text{Dist}_{24\text{h}}$) (alle gemessenen Parameter: → siehe Tabelle 2). Im Anschluss wird in der zweiten Phase das NLR durch das KLR ersetzt. Es kommt zunächst zu einem Abfall der Laufleistung (V_{\max} , $\text{Dist}_{24\text{h}}$) und im Verlauf zu einem schrittweisen Wiederanstieg, bis nach ca. 1 - 2 Wochen ein erneutes Plateau erreicht wird. Durch die vorangehende Trainingsphase im NLR wurde ein Plateau der muskuloskelettalen und kardiopulmonalen Leistungsfähigkeit erreicht, so dass der im KLR beobachtete Anstieg der Laufparameter dem Erlernen der komplexen Laufradsequenz und somit dem motorischen Lernen zuzurechnen ist. Zur exakten Beurteilung der Lernkurve und Verminderung der interindividuellen Varianz berechneten wir die relative Geschwindigkeit in Bezug auf die im KLR erreichte Maximalgeschwindigkeit ($V_{\max}\%$). Voraussetzung für ein aussagekräftiges Ergebnis sind zudem vergleichbare Leistungen in der Plateauphase im NLR, da sonst von verschiedenen Trainingszuständen ausgegangen werden muss und damit die Vergleichbarkeit der Gruppen nur eingeschränkt möglich ist.

Tabelle 2: Verwendete Parameter

Parameter	
V_{\max}	maximale Geschwindigkeit
$V_{\max}\%$	relative maximale Geschwindigkeit eines 24-Stunden-Intervalls in Bezug auf die maximale im KLR erreichte Geschwindigkeit
$\text{Dist}_{24\text{h}}$	gesamte zurückgelegte Strecke pro 24-Stunden-Intervall
Dist_{h}	gesamte zurückgelegte Strecke pro Stunde
$\text{Dist}_{\text{sum}}\%$	prozentualer Anteil der bis zu einem Zeitpunkt zurückgelegten Strecke an der gesamten Strecke dieses 24-Stunden-Intervalls
T_{run}	gesamte Zeit im Laufrad pro 24-Stunden-Intervall
N_{run}	Anzahl der Läufe pro 24-Stunden-Intervall
$\text{Dist}_{\text{mean}}$	mittlere Distanz eines Laufes
T_{mean}	mittlere Dauer eines Laufes

2.3 Spezieller Versuchsaufbau

2.3.1 D₂: Beeinträchtigung des Laufverhaltens durch D₂-Rezeptordefizienz (D₂^{-/-}) und durch pharmakologische Blockade des D₂-Rezeptors mittels Raclopridinjektionen

Um die Effekte des Fehlens von D₂-Rezeptoren zu untersuchen, verwendeten wir 6 männliche C57/Bl6-Mäuse und 7 männliche D₂-Knockout-Mäuse (D₂^{-/-}). Zum Zeitpunkt des Beginns der Aufzeichnungen waren die Versuchstiere 7 bis 9 Wochen alt.

Wir beobachteten das Laufverhalten über 2 Wochen im NLR. Bei stark unterschiedlicher Laufleistung im NLR wurde auf eine Untersuchung im KLR verzichtet, da die verminderte Laufleistung eine vergleichbare Trainingsphase und damit eine Vergleichbarkeit zur Kontrollgruppe nicht zulässt.

In einem weiteren Versuch mit 18 männlichen C57/Bl6-Mäusen wurde pharmakologisch eine zeitlich begrenzte selektive Blockade des D₂-Rezeptors erwirkt. Hierzu verwendeten wir den D_{2/3}-Rezeptorantagonisten Racloprid (Sigma-Aldrich) (Bindungskonstanten → siehe Tabelle 3). Wir führten intraperitoneale Injektionen (IP) mit den Dosierungen 1,5 mg/kg und 3 mg/kg sowie subkutane Injektionen (SC) mit den Dosierungen 3 mg/kg und 5 mg/kg durch. Racloprid (RCP) wurde in einer Tartratlösung aufgelöst und als Racloprid L-Tartrat-Lösung (Konzentration 0,15 mg/ml IP; 0,3 mg/ml SC, Injektionsvolumina 10/20 ml/kg IP; 10/16,67 ml/kg SC) injiziert. Die Versuchstiere hatten zunächst für drei Wochen Zugang zu dem normalen Laufrad.

Die 18 Versuchstiere wurden vor der ersten Injektion in drei Gruppen aufgeteilt. Je nach Gruppe erhielt jedes Tier zunächst an drei aufeinanderfolgenden Tagen um 18:00 Uhr entweder 3 mg/kg RCP, 1,5 mg/kg RCP oder ein äquivalentes Volumen des Lösungsmittels intraperitoneal. Vor der zweiten Injektionsreihe wurden die Mäuse 4 Wochen nicht behandelt, um mögliche länger anhaltende Wirkungen der Medikation zu vermeiden. Sie hatten weiterhin freien Zugang zum Laufrad, um einen stabilen kardiopulmonalen Trainingszustand zu halten. Dann erhielten die Tiere an drei aufeinanderfolgenden Tagen subkutane Injektionen von 3 mg/kg RCP, 5 mg/kg RCP oder Placebo.

Um den zeitlich begrenzten Einfluss einer pharmakologischen Blockade durch Racloprid zu bewerten, betrachteten wir die kumulative Distanz bis zu einem Zeitpunkt und stellten sie als prozentualen Anteil zu der gesamten Distanz des 24-Stunden-Intervalls dar (Dist_{sum}%).

Als weitere Variablen betrachteten wir die zurückgelegte Strecke pro Stunde und pro 24-Stunden-Intervall (Dist_h , Dist_{24h}) sowie die durchschnittliche Distanz ($\text{Dist}_{\text{mean}}$) und Dauer pro Lauf (T_{mean}).

Tabelle 3: Bindungskapazitäten von Racloprid

Rezeptorsubtyp	geringste K_i	höchste K_i	relative In-vivo-Bindung
D ₁	18000	18000	n.b.
D ₂	1	5	72
D ₃	1,8	3,5	57
D ₄	237	2400	2
D ₅	n.b.	n.b.	n.b.

(Vallone et al. 2000) (Vallone et al. 2000) (Riederer et al. 1998)

In vivo nach Riederer et al. (1998) und Vallone et al. (2000) zusammengetragene Bindungskonstanten K_i in nM.

2.3.2 D₃: Einfluss von Eisenmangel und D₃-Rezeptordefizienz (D₃^{-/-}) auf das motorische Lernverhalten

Zur Untersuchung der Bedeutung des D₃-Rezeptors für das motorische Lernverhalten bildeten wir 4 Gruppen à 15 Versuchstiere. Zwei Gruppen bestanden aus männlichen C57Bl6n Mäusen (D₃^{+/+}) (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland), die anderen beiden Gruppen aus männlichen Mäusen mit homozygoter D₃-Rezeptor Defizienz (D₃^{-/-}).

Jeweils eine Gruppe des jeweiligen Stammes erhielt normales Futter mit einem Standardeisengehalt von 179 mg/kg, die andere Gruppe erhielt ab der 4. Woche postnatal ein Spezialfutter mit einem reduzierten Eisengehalt von < 8mg/kg (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland).

Ab der 6. Woche nach Geburt bestückten wir die Käfige mit den normalen Laufräder für 20 Tage. Nach dem Erreichen der Plateauphase wurden die normalen Laufräder durch komplexe Laufräder für 2 Wochen ersetzt. Als Parameter für den Lernerfolg bestimmten wir die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) und zusätzlich die Gesamtzeit und -distanz pro 24-Stunden-Intervall (T_{run} , Dist_{24h}).

Zudem errechneten wir, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, für jeden Zeitpunkt die relative Geschwindigkeit in Bezug auf die maximale, während der Plateauphase im KLR erreichten Geschwindigkeit.

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 16.0.0 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) und GraphPad Prism 5, Version 5.04 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037 USA).

Für die Bewertung des Einflusses des D₂-Rezeptorstatus auf das Laufverhalten führten wir eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen mit der Zeit als Innersubjektfaktor und dem D₂-Rezeptorstatus als Zwischensubjektfaktor durch. Abhängige Variablen waren (bezogen auf ein 24-Stunden-Intervall) die maximale Geschwindigkeit (V_{\max}), die Distanz (Dist_{24h}) und die gesamte Zeit im Laufrad (T_{run}).

Für die Bewertung des Einflusses der pharmakologischen Intervention auf das Laufverhalten, führten wir separate Varianzanalysen mit Messwiederholungen an den Injektionstagen und den injektionsfreien Tagen mit der Zeit als Innersubjektfaktor und dem Medikament als Zwischensubjektfaktor durch. Abhängige Variablen waren (bezogen auf ein 1-Stundenintervall) die Distanz (Dist_h), der prozentuale Anteil der zurückgelegten Strecke an der gesamten Strecke des 24-Stunden-Intervalls ($\text{Dist}_{\text{sum}}\%$), die mittlere Distanz eines Laufes ($\text{Dist}_{\text{mean}}$) und die mittlere Dauer eines Laufes (T_{mean}).

Für die Bewertung des Einflusses des D₃-Rezeptorstatus und einer eisenreduzierten Diät führten wir eine dreifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen mit der Zeit als Innersubjektfaktor und der Diät und dem Rezeptorstatus als Zwischensubjektfaktoren durch. Abhängige Variablen waren die Parameter $V_{\max}\%$, Dist_{24h} und T_{run} .

Im Falle signifikanter Interaktionen ($p < 0,05$) in den Varianzanalysen wurden Post-hoc-t-Tests für Zwischengruppenvergleiche (unabhängige t-Tests) durchgeführt.

3. Ergebnisse

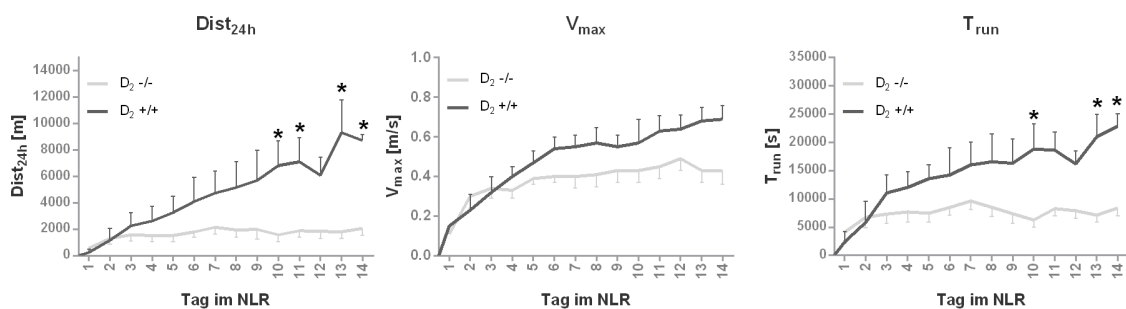
3.1 Einfluss des D₂-Rezeptors auf das Laufverhalten

3.1.1 D₂-Rezeptordefizienz (D₂^{-/-}) führt zu starker Einschränkung der motorischen Aktivität im Laufrad

Zur Beurteilung der Einflüsse eines Fehlens des D₂-Rezeptors auf die motorische Aktivität und Leistungsfähigkeit untersuchten wir das Laufverhalten von D₂-Knockout-Mäusen (D₂^{-/-}) im normalen Laufrad. Die D₂^{-/-} zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen eine deutlich reduzierte Aktivität, die sich in der zurückgelegten Strecke und der Zeit im Laufrad pro 24-Stunden-Intervall (Dist_{24h}, T_{run}) sowie der maximalen Geschwindigkeit (V_{max}) widerspiegelte (siehe Abbildung 3). Insbesondere bezüglich der Parameter Dist_{24h} und T_{run} zeigte sich bei den D₂^{-/-} eine deutlich reduzierte Steigerung während der Trainingsphase sowie reduzierte Werte während der Plateauphase.

Entsprechend der Messwiederholungs-ANOVA beeinflussten Zeit, Rezeptorstatus sowie die Interaktion beider die Parameter Dist_{24h} und T_{run} signifikant. Auf den Parameter V_{max} zeigte die ANOVA signifikante Einflüsse der Zeit und der Interaktion von Zeit und Rezeptorstatus. Der D₂^{-/-}-Rezeptorstatus ging im Vergleich zu D₂^{+/+} mit einer Reduzierung des Parameters Dist_{24h} an den Tagen 10,11,13 und 14 einher, wie durch t-Tests bestätigt werden konnte.

Abbildung 3: Einfluss einer D₂-Defizienz (D₂^{-/-}) auf die motorische Aktivität



Darstellung der Distanz (Dist_{24h}), der maximalen Geschwindigkeit (V_{max}) und der Zeit im Laufrad (T_{run}) bei D₂^{-/-} und D₂^{+/+} im normalen Laufrad (NLR). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Die D₂^{-/-} zeigen an mehreren Tagen signifikant geringere Werte in den Parametern Dist_{24h} und T_{run}. Bei V_{max} sind an keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zu erkennen.

Tabelle 4: Ergebnis der Messwiederholungs-ANOVA: D₂^{-/-} vs. D₂^{+/+}

D ₂ ^{-/-} vs. D ₂ ^{+/+}	V _{max}			Dist _{24h}		T _{run}	
	df	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
NLR							
Zeit	13	19,23	< 0,0001	8,989	< 0,0001	5,202	< 0,0001
Rezeptor	1	2,620	0,1338	6,670	0,0255	7,977	0,0165
Zeit × Rezeptor	13	2,635	0,0025	5,92	< 0,0001	3,03	< 0,0001

3.1.2 Raclopridinjektionen vor Beginn der Aktivitätsphase bewirken dosisabhängige reversible Verschiebungen des nächtlichen Aktivitätsprofils

Wir untersuchten das Laufverhalten nach intraperitonealer und subkutaner Applikation von Racloprid (RCP, Sigma-Aldrich), um eine zeitlich begrenzte Blockade des D₂-Rezeptors zu erwirken. Sowohl nach intraperitonealer als auch nach subkutaner Injektion von RCP zeigte sich eine dosisabhängige Verschiebung des Aktivitätsmaximums ohne Einfluss auf die insgesamt zurückgelegte Strecke pro 24-Stunden-Intervall.

Alle Gruppen zeigten am Tag vor der ersten Injektion ein physiologisches Aktivitätsprofil mit Aktivitätsmaximum zwischen 21:00 und 23:00 Uhr. Nach Injektion von RCP kam es zu einer initialen Reduktion der Laufleistung, während im späteren Verlauf der aktiven Phase die Laufleistung gesteigert war.

Diese RCP-induzierte Verschiebung der Aktivitätsmaxima führte aber nicht zu einer Reduktion von Dist_{24h} (siehe Abbildung 4, 5), da die mit RCP behandelten Mäuse die geringere Leistung in der frühen Phase mit längeren Läufen in der Spätphase kompensieren konnten. Sowohl die Dauer eines Laufes (T_{mean}) als auch die zurückgelegte Strecke pro Lauf (Dist_{mean}) waren dabei verlängert. Diese Ergebnisse ergaben sich sowohl bei den intraperitonealen als auch bei den subkutanen Injektionen (siehe Abbildungen 6-9).

Die subkutane Injektion von 5 mg/kg RCP reduzierte tendenziell (p=0,08) die zurückgelegte Strecke pro 24-Stunden-Intervall am 3. Injektionstag aufgrund einer eingeschränkten Kompensation der initial verminderten Laufleistung in der Spätphase der Aktivitätsphase (siehe Abbildung 5).

Entsprechend der Messwiederholungs-ANOVA beeinflussten Zeit, Behandlung sowie die Interaktion beider die Parameter Dist_{sum}% und Dist_h an den Injektionstagen 2 und 3 bei den

intraperitonealen und an allen Injektionstagen bei den subkutanen Injektionen signifikant. Am Tag vor der ersten und am Tag nach der letzten Injektion sowie am ersten Injektionstag hatte bei der intraperitonealen Applikation laut Messwiederholungs-ANOVA nur die Zeit einen signifikanten Einfluss auf Dist_h und $\text{Dist}_{\text{sum}}\%$.

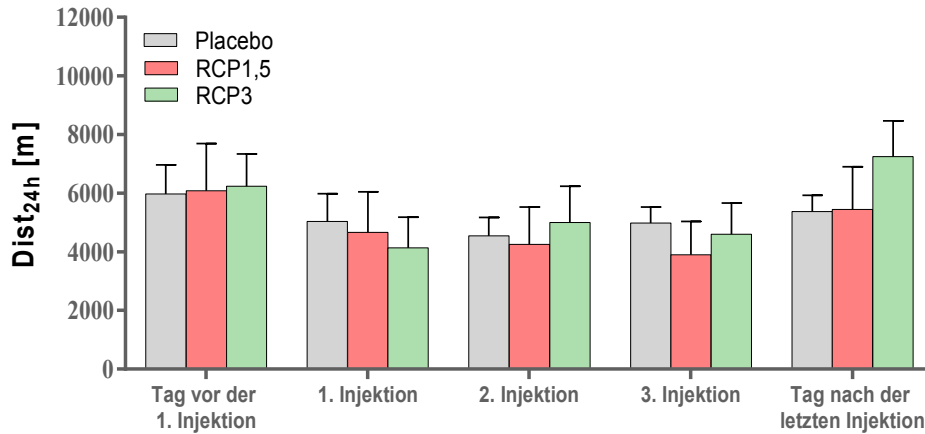
Die Messwiederholungs-ANOVA zeigte für alle drei Injektionstage bei beiden Applikationsformen signifikante Einflüsse der Zeit und der Interaktion von Zeit und Behandlung auf die Parameter $\text{Dist}_{\text{mean}}$ und T_{mean} . Am Tag vor der ersten Injektion und am ersten Tag nach der letzten Injektion hatte laut Messwiederholungs-ANOVA nur die Zeit einen signifikanten Einfluss auf die Parameter $\text{Dist}_{\text{mean}}$ und T_{mean} .

Die RCP-Gabe führte in beiden Dosierungen und beiden Applikationsformen laut Post-hoc-t-Tests an zahlreichen Zeitpunkten zu einer signifikanten Abnahme von $\text{Dist}_{\text{sum}}\%$ im Vergleich zu der Placebogabe an den Injektionstagen 2 und 3 (siehe 7.3.: Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse der Post-hoc-t-Tests).

Die RCP-Gabe führte weiterhin in beiden Dosierungen und beiden Applikationsformen laut Post-hoc-t-Tests zu signifikanten Veränderungen von $\text{Dist}_{\text{mean}}$ und T_{mean} im Vergleich zur Placebogabe an den Injektionstagen 1 und 3.

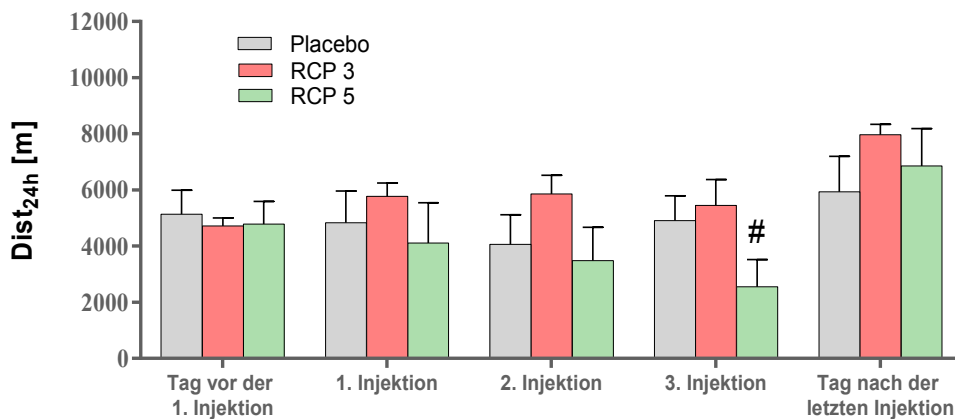
Post-hoc-t-Tests zeigten zusätzlich für die RCP-5-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen einen Trend ($p = 0,08$) zu einer geringeren Dist_{24h} am 3. Injektionstag.

Abbildung 4: Intraperitoneale Injektionen von RCP



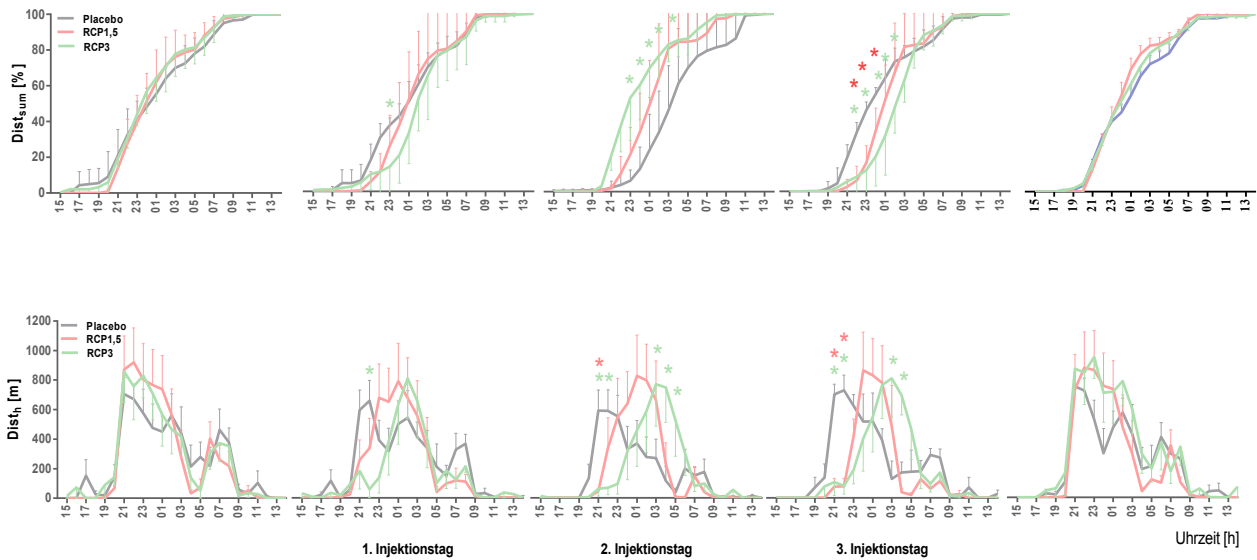
Darstellung der Gesamtstrecke im 24-Stunden-Intervall ($Dist_{24h}$) nach intraperitonealer Injektion von RCP 1,5 mg/kg, RCP 3 mg/kg und Placebo. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Trotz unterschiedlicher Aktivitätsprofile in der Nacht (siehe Abbildung 6,7) hatte die intraperitoneale Applikation von RCP keinen Einfluss auf die $Dist_{24h}$.

Abbildung 5: Subkutane Injektionen von RCP

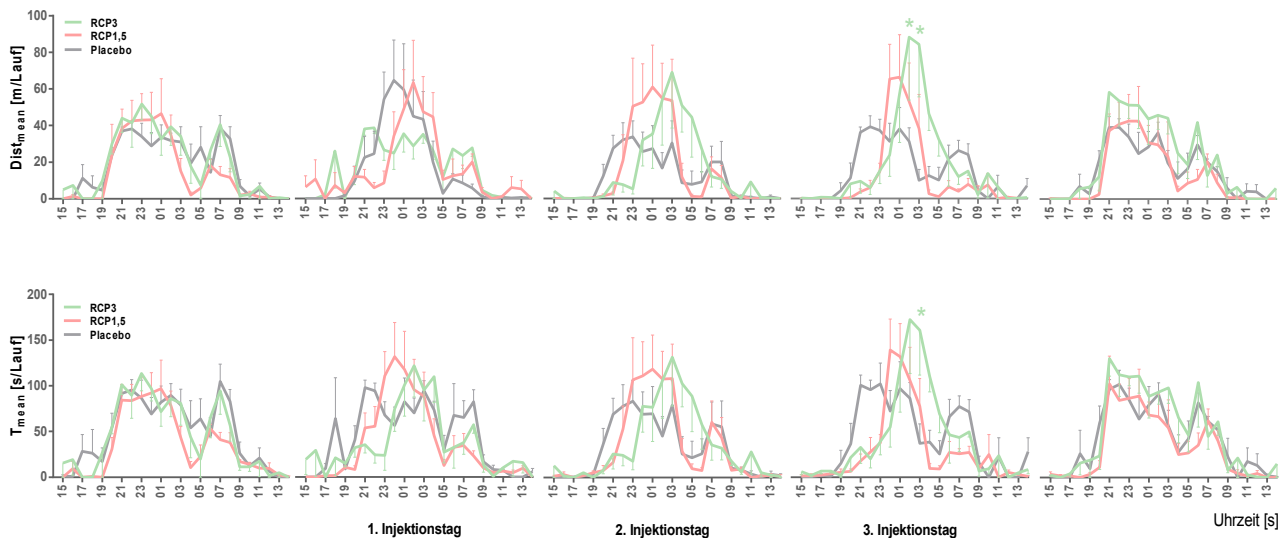


Darstellung der Gesamtstrecke im 24-Stunden-Intervall ($Dist_{24h}$) nach subkutaner Injektion von RCP 3 mg/kg, RCP 5 mg/kg und Placebo. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Trotz unterschiedlicher Aktivitätsprofile in der Nacht (siehe Abbildung 6,7) hatte die intraperitoneale Applikation von RCP keinen Einfluss auf die $Dist_{24h}$. Allerdings zeigte sich im Unterschied zu der intraperitonealen Applikation am 3. Injektionstag bei der RCP-5-Gruppe ein Trend (#: $p = 0,08$) zu einer geringeren $Dist_{24h}$.

Abbildung 6, 7: Intraperitoneale Injektionen von RCP: stündliche Intervalle

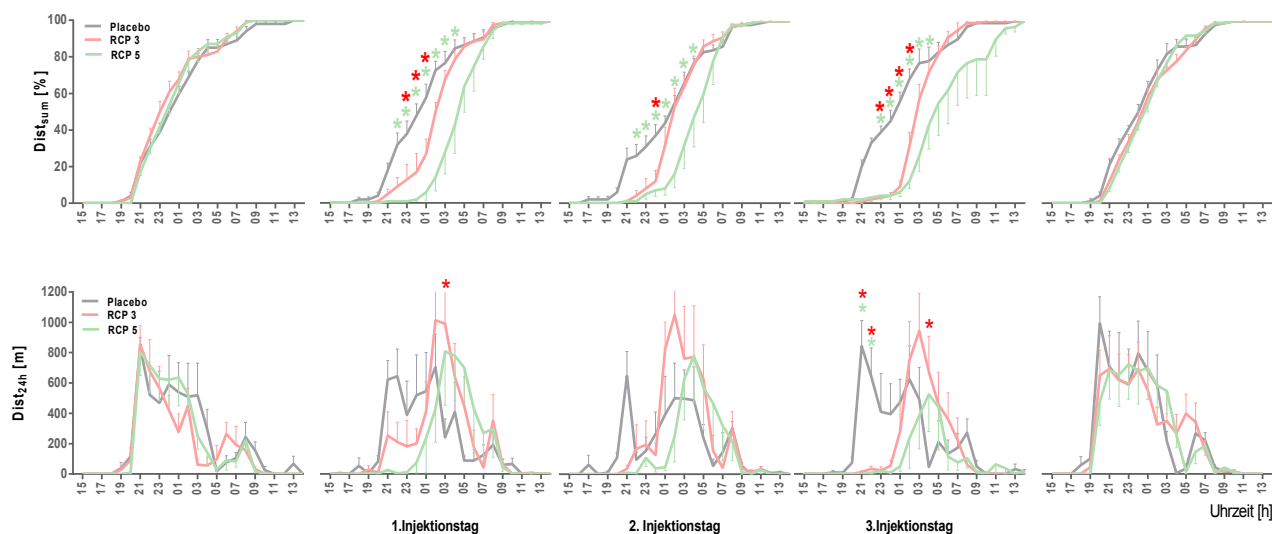


Darstellung der Strecke pro 1-Stunden-Intervall ($Dist_h$) und des prozentualen Anteils an der Gesamtstrecke des 24-Stunden-Intervalls ($Dist_{sum}\%$) nach intraperitonealer Injektion von RCP 1,5mg/kg, RCP 3mg/kg und Placebo. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. An den Tagen vor und nach den abendlichen Injektionen zeigten alle 3 Gruppen die gleichen Aktivitätsprofile. An den Injektionstagen führten RCP-Injektionen zu einer Verschiebung des Aktivitätsmaximums mit signifikanten Unterschieden der in $Dist_h$ und $Dist_{sum}\%$ im Vergleich zur Placebogruppe (* = RCP 1,5 vs. Placebo, $p < 0,05$; * = RCP 3 vs. Placebo, $p < 0,05$).

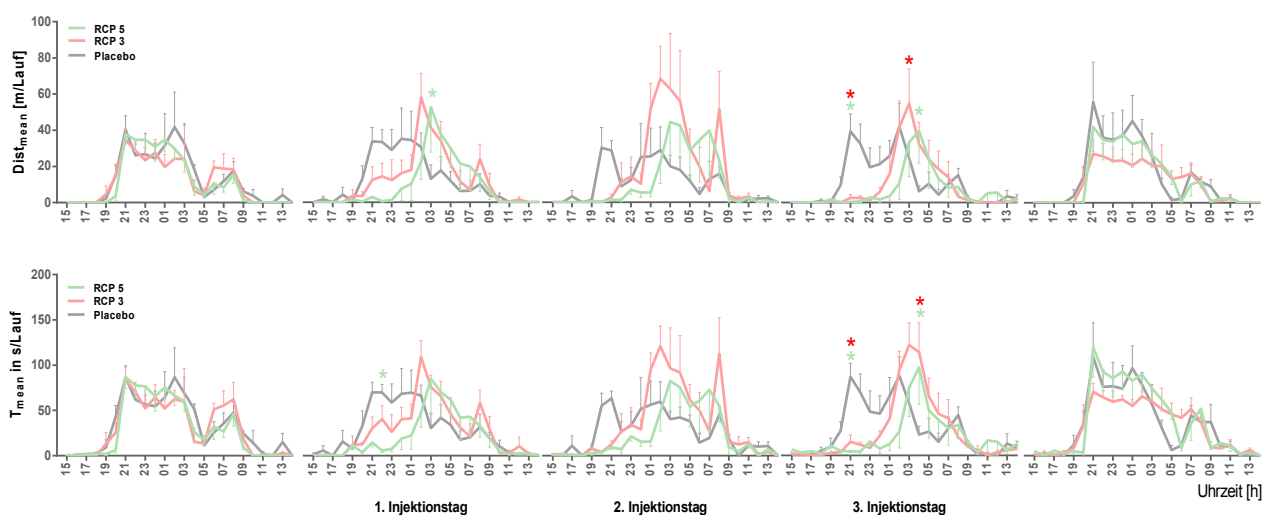


Darstellung der mittleren Distanz ($Dist_{mean}$) und Dauer (T_{run}) pro 1-Stunden-Intervall nach intraperitonealer Injektion von RCP 1,5mg/kg, RCP 3mg/kg und Placebo. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Intraperitoneale RCP-Injektionen führten zu signifikant höheren $Dist_{mean}$ und T_{mean} im Verlauf der Aktivitätsphase im Vergleich zur Placebogruppe (* = RCP 1,5 vs. Placebo, $p < 0,05$; * = RCP 3 vs. Placebo, $p < 0,05$), im Sinne einer kompensatorischen Erhöhung von Laufdauer und —distanz in der zweiten Nachthälfte.

Abbildung 8, 9: Subkutane Injektionen von RCP: stündliche Intervalle



Darstellung der Strecke pro 1-Stunden-Intervall ($Dist_h$) und des prozentualen Anteils an der Gesamtstrecke des 24-Stunden-Intervalls ($Dist_{sum}\%$) nach subkutaner Injektion von RCP 3mg/kg, RCP 5mg/kg und Placebo. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. An den Tagen vor und nach den abendlichen Injektionen zeigten alle 3 Gruppen die gleichen Aktivitätsprofile. Analog zu den Ergebnissen der intraperitonealen Injektionen führten RCP-Injektionen an den Injektionstagen zu einer Verschiebung des Aktivitätsmaximums mit signifikanten Unterschieden der in $Dist_h$ und $Dist_{sum}\%$ im Vergleich zur Placebogruppe (* = RCP 3 vs. Placebo, $p < 0,05$; * = RCP 5 vs. Placebo, $p < 0,05$).



Darstellung der mittleren Distanz ($Dist_{mean}$) und Dauer (T_{run}) pro 1-Stunden-Intervall nach subkutaner Injektion von RCP 3mg/kg, RCP 5mg/kg und Placebo. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Subkutane RCP-Injektionen führten zu signifikant höherer $Dist_{mean}$ und T_{mean} im Verlauf der Aktivitätsphase im Vergleich zur Placebogruppe (* = RCP 3 vs. Placebo, $p < 0,05$; * = RCP 5 vs. Placebo, $p < 0,05$). V.a. bei der 2. Und 3. Injektion fällt der kompensatorische Anstieg von Laufdauer und -distanz nach Injektion von RCP 5 mg/kg geringer aus.

Tabelle 5: Ergebnis der Messwiederholungs-ANOVA: intraperitoneale Injektionen mit RCP

IP-Injektionen	Dist _{sum}			Dist _{mean}		T _{mean}	
	df	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	P-Wert
Tag vor 1.Injektion							
Zeit	23	580,9	< 0,0001	17,3	< 0,0001	17,4	< 0,0001
Injektion	2	0,4	0,6970	0,7	0,5354	1,3	0,2942
Zeit × Injektion	46	0,8	0,8165	0,0	0,5826	0,0	0,7530
1. Injektion							
Zeit	23	287,3	< 0,0001	0,0	< 0,0001	0,0	< 0,0001
Injektion	2	0,9	0,4135	0,0	0,9824	0,5	0,6331
Zeit × Injektion	46	1,3	0,1089	1,6	0,0127	1,7	0,0065
2. Injektion							
Zeit	23	147,7	< 0,0001	0,0	< 0,0001	0,0	< 0,0001
Injektion	2	3,9	0,0462	0,0	0,7565	0,1	0,9196
Zeit × Injektion	46	2,7	< 0,0001	1,8	0,0016	0,0	0,0105
3. Injektion							
Zeit	23	477,1	< 0,0001	11,2	< 0,0001	12,7	< 0,0001
Injektion	2	5,3	0,0197	1,0	0,3832	1,4	0,2756
Zeit × Injektion	46	5,1	< 0,0001	0,0	< 0,0001	2,5	< 0,0001
Tag nach 3.Injektion							
Zeit	23	819,7	< 0,0001	16,4	< 0,0001	18,0	< 0,0001
Injektion	2	1,0	0,3764	2,2	0,1496	0,0	0,1674
Zeit × Injektion	46	1,1	0,2509	0,0	0,8333	0,0	0,9

Tabelle 6: Ergebnis der Messwiederholungs-ANOVA: subkutane Injektionen mit RCP

SC-Injektionen	Dist _{sum}			Dist _{mean}		T _{mean}	
	df	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Tag vor 1.Injektion							
Zeit	23	838,3	< 0,0001	18,2	< 0,001	22,0	< 0,001
Injektion	2	0,7	0,520	0,0	0,867	0,2	0,851
Zeit × Injektion	46	1,0	0,506	0,0	0,973	0,0	0,915
1. Injektion							
Zeit	23	263,6	< 0,001	8,7	< 0,001	0,0	< 0,001
Injektion	2	11,5	< 0,001	0,0	0,794	0,0	0,502
Zeit × Injektion	46	5,7	< 0,001	2,0	< 0,001	1,9	< 0,001
2. Injektion							
Zeit	23	267,2	< 0,001	6,2	< 0,001	8,0	< 0,001
Injektion	2	7,0	0,008	0,0	0,412	0,0	0,278
Zeit × Injektion	46	3,8	< 0,001	1,6	0,016	1,5	0,017
3. Injektion							
Zeit	23	168,0	< 0,001	9,2	< 0,001	9,9	< 0,001
Injektion	2	5,9	0,016	0,0	0,638	1,2	0,345
Zeit × Injektion	46	4,3	< 0,001	0,0	< 0,0001	2,5	< 0,001
Tag nach 3.Injektion							
Zeit	23	1219,0	< 0,001	0,000	< 0,001	23,8	< 0,001
Injektion	2	1,1	0,374	0,000	0,868	0,3	0,760
Zeit × Injektion	46	1,8	0,002	0,000	0,692	1,2	0,204

3.2 Versuchstiere mit Eisendefizienz zeigen geringere $\text{Dist}_{24\text{h}}$ und T_{run} unabhängig vom D_3 -Rezeptorstatus. Versuchstiere mit Eisendefizienz und negativem D_3 -Rezeptorstatus zeigen geringere V_{max} und $V_{\text{max}}\%$ in der Lernphase.

Um den Effekt von eisenreduzierter Diät (ID) im Vergleich zu normaler Diät (ND) und negativem Rezeptorstatus ($D_3^{-/-}$) im Vergleich zum Wildtyp ($D_3^{+/+}$) auf das motorische Lernen bei Mäusen zu evaluieren, betrachteten wir die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) als aussagekräftigen Parameter für das Erlernen motorischer Fähigkeiten im Laufradmodell (Liebetanz und Merkler 2006) über einen Zeitraum von 14 Tagen im komplexen Laufrad (KLR). Die Lernphase endete bei allen Gruppen nach den ersten sechs Tagen mit dem Erreichen eines V_{max} -betreffenden vergleichbaren Plateaus (siehe Material und Methoden: Abschnitt 2.2.).

ID führte während der Lernphase bei $D_3^{-/-}$ zu einem verzögerten Erreichen des V_{max} -Plateaus. Bei $D_3^{+/+}$ konnte hingegen keine Beeinträchtigung der Lernkurve durch ID gezeigt werden. Eisenmangel beeinflusst somit abhängig vom D_3 -Rezeptorstatus die maximale Geschwindigkeit während der Lernphase (siehe Abbildung 10).

ID führte zudem sowohl bei $D_3^{-/-}$ als auch bei $D_3^{+/+}$ zu einer Reduktion der Distanz und der Zeit im KLR pro 24-Stunden-Intervall ($\text{Dist}_{24\text{h}}$, T_{run}) während der Plateauphase. Eisenmangel beeinflusst somit die zurückgelegte Strecke und die Gesamtzeit im Laufrad unabhängig vom D_3 -Rezeptorstatus (siehe Abbildungen 11,12).

Unterschiede zwischen den beiden Rezeptorstatus zeigten sich unter normaler Diät in dem Parameter $\text{Dist}_{24\text{h}}$. $D_3^{-/-}$ legten im Vergleich zu $D_3^{+/+}$ eine längere Strecke pro 24-Stunden-Intervall zurück, was einer gesteigerten motorischen Aktivität bei D_3 -Defizienz entspricht.

Die Messwiederholungs-ANOVA zeigte während der Lernphase signifikante Einflüsse der Zeit und der Interaktion von Diät und Rezeptorstatus auf die relative maximale Geschwindigkeit ($V_{\text{max}}\%$). Für die Plateauphase (Tag 7 – 14) zeigte die Messwiederholungs-ANOVA keine signifikanten Effekte von Eisendefizienz und Rezeptorstatus auf $V_{\text{max}}\%$.

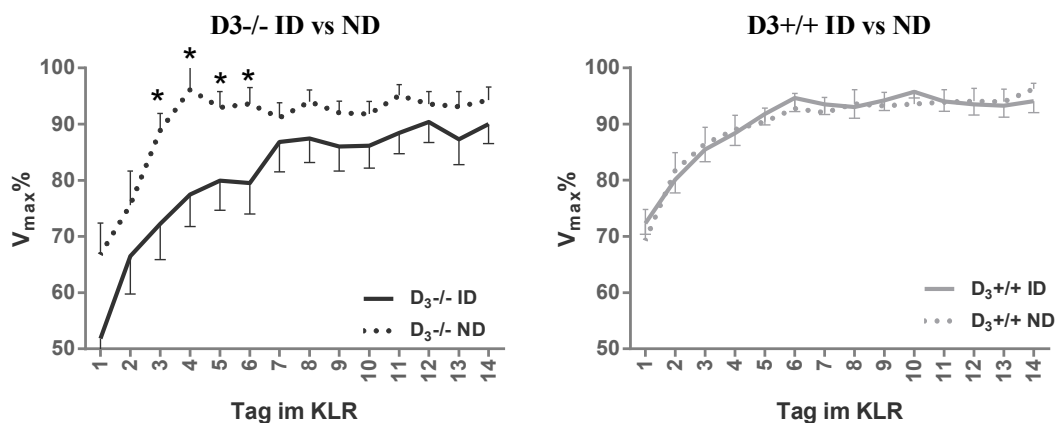
Die Messwiederholungs-ANOVA zeigte über den gesamten Zeitraum auch einen Einfluss der Zeit, der Diät sowie der Interaktion beider auf $\text{Dist}_{24\text{h}}$. Die Gesamtzeit im Laufrad pro 24-Stunden-Intervall wurde signifikant von der Zeit und der Interaktion von Zeit und Rezeptorstatus beeinflusst.

Eisendefizienz verringerte laut t-Tests bei $D_3^{-/-}$ Tieren die $V_{\max}\%$ an den Lernphasetagen 3-6. Zudem war die $V_{\max}\%$ bei $D_3^{-/-}$ ID an den Tagen 1,5 und 6 signifikant reduziert im Vergleich zu den $D_3^{-/-}$ ND Tieren unter der gleichen Diät.

Bei $D_3^{+/+}$ konnte kein Effekt der Diät auf die $V_{\max}\%$ gezeigt werden. Ebenso hatte die alleinige D_3 -Defizienz bei Tieren mit normaler Diät auf die $V_{\max}\%$ keinen Einfluss.

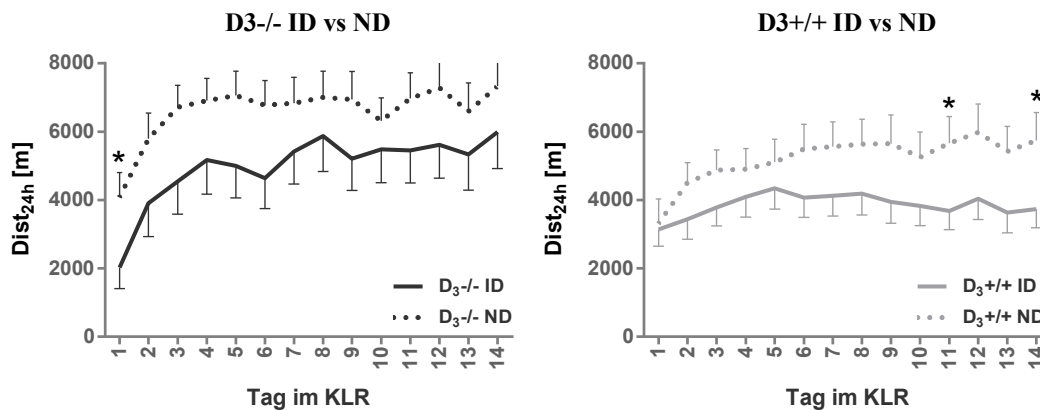
Bei $D_3^{-/-}$ reduzierte eine eisendefiziente Ernährung die Distanz pro 24-Stunden-Intervall im Vergleich zu einer normalen Ernährung mit signifikanten Unterschieden in t-Tests an Tag 1. Bei $D_3^{+/+}$ reduzierte eine eisendefiziente Ernährung die Distanz pro 24-Stunden-Intervall im Vergleich zu einer normalen Ernährung mit signifikanten Unterschieden in t-Tests an den Tagen 11 und 14.

Abbildung 10: Lernkurven im KLR anhand der $V_{\max}\%$



Darstellung des Einflusses einer eisenreduzierten Diät (ID) im Vergleich zu normaler Diät (ND) auf die relative maximale Geschwindigkeit im KLR ($V_{\max}\%$) bei $D_3^{-/-}$ (1. Abbildung) und bei $D_3^{+/+}$ (2. Abbildung). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Eisendefizienz führte bei $D_3^{-/-}$ zu einer signifikant geringeren $V_{\max}\%$ (*: $p < 0,05$) im Vergleich zu den $D_3^{-/-}$ -Vergleichstieren ohne Eisendefizienz. Die eisenreduzierten $D_3^{-/-}$ -Tiere erlernen demnach das Laufmuster des KLR im Vergleich zu ihren Kontrollen verzögert, während bei den $D_3^{+/+}$ kein Unterschied zwischen ID und ND zu erkennen ist.

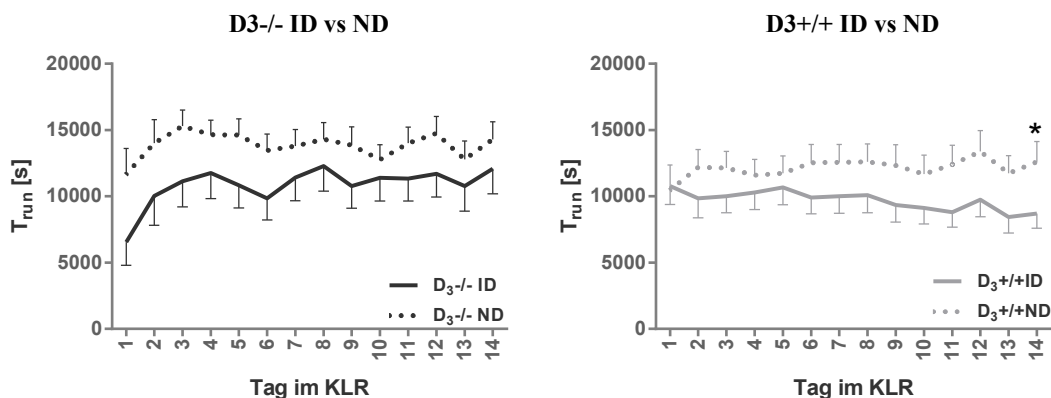
Abbildung 11: Distanz pro 24-Stunden-Intervall im KLR



Darstellung des Einflusses einer eisenreduzierten Diät (ID) im Vergleich zu normaler Diät (ND) auf die Distanz pro 24-Stunden-Intervall ($Dist_{24h}$) im KLR bei $D_3^{-/-}$ (1. Abbildung) und bei $D_3^{+/+}$ (2. Abbildung). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Eisendefizienz (ID) führte bei $D_3^{-/-}$ und $D_3^{+/+}$ zu einer signifikant geringeren $Dist_{24h}$ (*: $p < 0,05$). Eisendefiziente Mäuse legen demnach unabhängig vom D_3 -Rezeptorstatus eine geringere Strecke pro 24-Stunden-Intervall zurück.

Abbildung 12: Gesamte Zeit pro 24-Stunden-Intervall im KLR



Darstellung des Einflusses einer eisenreduzierten Diät (ID) im Vergleich zu normaler Diät (ND) auf die Zeit im Laufrad pro 24-Stunden-Intervall (T_{run}) im KLR bei $D_3^{-/-}$ (1. Abbildung) und bei $D_3^{+/+}$ (2. Abbildung). Eisendefizienz führte bei $D_3^{-/-}$ und $D_3^{+/+}$ zu einer signifikant geringeren T_{run} ($p < 0,05$).

Tabelle 7: Ergebnis der Messwiederholungs-ANOVA: Eisendefizienz und negativer D₃-Rezeptorstatus im KLR

	V _{max} %		Dist _{24h}		T _{run}		
	df	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Lernphase (KLR)							
Zeit	5	53,222	0,001	35,960	0,001	4,939	0,001
Zeit × Rezeptor	5	2,192	0,056	4,588	0,001	4,106	0,001
Zeit × Diät	5	0,354	0,879	0,693	0,629	0,327	0,896
Zeit × Rez. × Diät	5	0,789	0,558	0,562	0,729	1,152	0,333
Rezeptor	1	2,781	0,101	1,998	0,163	0,569	0,454
Diät	1	2,954	0,092	4,527	0,038	3,519	0,066
Rezeptor × Diät	1	4,396	0,041	0,676	0,415	0,841	0,363
Plateau (KLR)							
Zeit	7	1,809	0,084	7,030	0,001	11,900	0,001
Zeit × Rezeptor	7	0,924	0,488	1,940	0,063	1,758	0,095
Zeit × Diät	7	0,377	0,916	2,625	0,001	2,714	0,009
Zeit × Rez. × Diät	7	0,586	0,767	0,731	0,646	1,036	0,405
Rezeptor	1	1,776	0,189	3,487	0,068	1,550	0,219
Diät	1	1,048	0,311	3,804	0,057	3,601	0,064
Rezeptor × Diät	1	1,113	0,297	0,051	0,822	0,071	0,791

4. Diskussion

4.1 Auswirkungen einer Beeinträchtigung der D₂-Rezeptoraktivität auf die motorische Aktivität im normalen Laufrad

4.1.1 D₂-Rezeptordefizienz führt zu einer deutlichen Einschränkung der motorischen Aktivität

Bei der Beobachtung des Verhaltens der D₂-Knockout-Mäusen konnte zunächst eine generelle Einschränkung der motorischen Aktivität in allen Parametern gezeigt werden. Die geringere Gesamtdistanz ließ sich vor allem auf eine geringere Gesamtzeit im Laufrad zurückführen, weniger auf eine reduzierte maximale Geschwindigkeit. D₂-Defizienz führt demnach grundsätzlich zu einer reduzierten Aktivität im Laufrad, was die Reduktion aller Parameter erklärt. Eine durch fehlende D₂-Aktivität induzierte Bradykinese bei Mäusen steht im Einklang mit zahlreichen Studien, die einen Parkinsonoid als Ursache vermuten (Kelly et al. 1998; Baik et al. 1995). Kelly und Mitarbeiter und Baik und Mitarbeiter stellten dabei in Open-field-Versuchen fest, dass D₂-defiziente Mäuse reduzierte Spontanbewegungen zeigen. Sie folgerten daraus, dass die reduzierte Aktivität auf eine Störung im extrapyramidal-motorischen System zurückzuführen sei.

Die signifikant reduzierte Gesamtzeit und -strecke im Laufrad ohne signifikante Reduktion der Maximal-Geschwindigkeit lassen sich durch einen Parkinsonoid aber nur begrenzt erklären, da bei einer rein motorischen Beeinträchtigung der Versuchstiere im Sinne einer Bradykinese eine ebenso deutlich verminderte Maximalgeschwindigkeit zu erwarten wäre. Daher ist neben der reinen Beeinträchtigung der Motorik eine weitere Ursache, die die deutlich reduzierte Gesamtzeit und Gesamtstrecke im Laufrad erklärt, wahrscheinlich. Da unser Laufrad-Versuchsaufbau die freiwillige Nutzung des Laufrads untersucht, ist ein reduzierter Bewegungsdrang und damit ein reduzierter Antrieb, das Laufrad zu verwenden, eine mögliche Erklärung für die verminderte Laufradnutzung.

Das Fehlen des D₂-Rezeptors bedingt schließlich auch eine Störung der mesokortikalen und mesolimbischen Bahn, die entscheidend an der Motivationsbildung beteiligt sind (Wise 2008).

Kelly und Mitarbeiter (1998) konnten in den erwähnten Versuchen in Aktivitätskammern

und Rotarodversuchen an Mäusen deutlich machen, dass eine D₂-Defizienz vor allem den Beginn einer motorischen Aktion einschränkt. Interessanterweise war die maximale Zeit auf dem Rotarod nach Abschluss der Trainingsphase bei den D₂-defizienten Mäusen nicht reduziert, die Trainingsphase bis zum Erreichen eines Plateaus jedoch verlängert. Diese Ergebnisse sind mit unseren Ergebnissen und einer Reduktion des Antriebs zu motorischer Aktivität ohne vorrangige motorische Beeinträchtigung gut vereinbar. Eine Reduktion des Antriebs durch D₂-Defizienz konnte zudem durch pharmakologische D₂-Blockade mit Antipsychotika nachgewiesen werden (Wise 2004). Hiermit im Einklang stehen auch die Ergebnisse von Simonen und Mitarbeiter (2003), die in Humanstudien nachweisen konnten, dass eine reduzierte D₂-Rezeptoraktivität aufgrund eines Genpolymorphismus mit einer verminderten Motivation zu körperlicher Aktivität einhergeht.

Drago und Mitarbeiter (1999) und Clifford und Mitarbeiter (2001) wiesen im Mäuseversuch nach, dass motivationsunabhängige motorische Bewegungen im Gegensatz dazu nicht von einem intakten D₂-Rezeptor abhängig sind. Sie konnten veranschaulichen, dass habituelle Bewegungen wie das Klettern im Käfig und das Reinigen des Körpers durch eine D₂-Defizienz nicht beeinträchtigt sind. Die Effekte der D₂-Defizienz machen sich insbesondere in jenen Arealen bemerkbar, in denen physiologischerweise eine erhöhte D₂-Rezeptordichte besteht, wie z.B. im VTA und dem Nucleus accumbens (Missale et al. 1998). Diese Strukturen stellen als Teil des mesolimbischen Systems eine entscheidende Schnittstelle zwischen Motivation bzw. Antrieb und Motorik dar (Mogenson et al. 1980; Wise 2004). Die Störung der dopaminergen Transmission von VTA und Nucleus accumbens zu präfrontalem Kortex und Basalganglien bietet in diesem Zusammenhang eine mögliche Erklärung für die Beeinträchtigung des Antriebs bei unseren Versuchstieren.

4.1.2 Pharmakologische Blockade des D₂-Rezeptors durch Racloprid führt zu einer Verschiebung der Aktivitätsmaxima in der Aktivitätsphase

Injektionen mit Racloprid (RCP) führten zu einer reversiblen, dosisabhängigen Verschiebung der Leistungsmaxima in der Aktivitätsphase. Vor den Injektionen entwickelten alle Versuchstiere unauffällige Aktivitätsprofile. Trotz der stark unterschiedlichen Aktivitätsprofile mit divergierenden stündlichen Messwerten erreichten jedoch alle Versuchstiere die gleiche Gesamtdistanz über 24 Stunden.

Nach der RCP-Injektion fielen die Versuchstiere während der ersten Stunden durch eine

deutlich reduzierte Aktivität im Laufrad auf. Diese spiegelte sich vor allem in einer geringeren stündlichen Distanz und folglich auch im prozentualen Anteil der bis zu dem jeweiligen Zeitpunkt zurückgelegten Strecke des 24-Stunden-Intervalls wider. Nach der Placebo-Injektion befand sich das Aktivitätsmaximum der Kontrolltiere weiterhin zwischen 21:00 und 23:00 Uhr. Im Unterschied dazu führte die intraperitoneale Injektion von RCP 1,5 mg/kg an allen Injektionstagen zu einer Verschiebung des Aktivitätsmaximums um ca. 2-3 Stunden, die Injektion von RCP 3 mg/kg um etwa 4-6 Stunden. Bei den subkutanen Applikationen zeigten sich äquivalent dazu die Verschiebungen um 2-3 Stunden nach Injektion von RCP 3 mg/kg und um 4-6 Stunden nach Injektion von RCP 5 mg/kg. Die signifikante Reduktion der Aktivität innerhalb der ersten 4 bzw. 6 Stunden nach Injektion des D_2 -Antagonisten Racloprid steht im Einklang zu unseren in Kapitel 4.1.1. beschriebenen Ergebnissen bei D_2 -Knockout-Mäusen. Auch bei den Racloprid-Applikationen ist neben einer Beeinträchtigung des extrapyramidal-motorischen D_2 -Systems eine Störung der D_2 -Signalwege im mesolimbischen und mesokortikalen System (Riederer et al. 1998) wahrscheinlich. Das mesolimbische und das mesokortikale System nehmen eine entscheidende Rolle bei der Motivationsbildung zu motorischer Aktivität ein (Clifford et al. 2001; Drago et al. 1999; Simonen et al. 1998; Wise 2004). Unsere Ergebnisse könnten demnach darauf hindeuten, dass den mit Racloprid behandelten Versuchstieren aufgrund der pharmakologischen D_2 -Blockade der Antrieb fehlte, der motorischen Aktivität zu Beginn der Nacht (entsprechend der physiologischen Aktivität) zu folgen.

Im Unterschied zu den Ergebnissen bei den D_2 -Knockout-Mäusen zeigte sich nach RCP-Injektion eine deutlich ausgeprägtere Einschränkung der motorischen Aktivität. Diese ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Racloprid nicht selektiv am D_2 -Rezeptor, sondern zum Teil auch am D_3 -Rezeptor (siehe Material und Methoden: Tabelle 3) bindet. Jung und Mitarbeiter (1999) konnten bei D_2 - und D_3 -Rezeptor-defizienten Mäusen darlegen, dass die Abwesenheit beider Rezeptoren synergistisch wirkt und im Vergleich zur alleinigen D_2 -Defizienz eine ausgeprägtere Beeinträchtigung der Lokomotion nach sich zieht.

Nach der Phase einer beeinträchtigten Lokomotion war bei allen mit RCP behandelten Tieren eine signifikant gesteigerte Aktivität nachweisbar, die sich in einer verlängerten Dauer und Strecke pro Lauf manifestierte. Diese Phase gesteigerter Aktivität und die trotz initialer Minderaktivität unveränderte $Dist_{24h}$ sind ein weiteres Argument für einen über die rein motorische Beeinträchtigung nach D_2 -Blockade hinausgehenden RCP-Effekt.

Barrett und Mitarbeiter (1992) wiesen eine vergleichbare Hyperlokomotion nach längerer

D₂-Blockade (20-48 h) mit Haloperidol bei Ratten nach. Wise und Carlezon (1994) konnten bei Ratten in Aktivitätskammerversuchen vergleichbare verlängerte Läufe interessanterweise durch die Injektion von D₂-Agonisten (Bromocriptin) erzielen.

Diese Ergebnisse sprechen für eine Steigerung der motorischen Aktivität in Phasen erhöhter D₂R-Aktivierung, was einen Reboundmechanismus als Ursache der bei Nachlassen der D₂R-Blockade zu beobachtenden Hyperaktivität nahelegt.

Bei maximaler Dosierung (5 mg/kg) wurde der Beginn der Aktivitätsphase so weit nach hinten verschoben, dass ein Erreichen der Gesamtdistanz pro 24-Stundenintervall der unbehandelten Tiere innerhalb der Aktivitätsphase nicht mehr erfolgen konnte. In diesem Falle fand sich eine tendenziell verminderte Gesamtdistanz. Eine Ausdehnung der Aktivität in die Ruhephase erfolgte nicht. Dies ist am ehesten dadurch zu erklären, dass das D₂-System die Aktivitätsphase nicht definiert, sondern den zirkadianen Taktgebern unterliegt. Die Abwesenheit von D₂-Rezeptoren im Nucleus subthalamicus (Weiner et al. 1991) als zirkadianen Melatonin-abhängigen (Devlin und Kay 2001; Khaldy et al. 2002) Taktgeber (Rusak und Zucker 1979) bietet eine Erklärung für unsere Ergebnisse.

4.2 Auswirkungen einer diätetischen Beeinflussung des Dopaminstoffwechsels durch Eisenmangel auf die motorische Aktivität im KLR.

Eisendefizienz (ID) reduzierte unabhängig vom D₃-Rezeptorstatus (D₃^{-/-} und D₃^{+/+}) die Distanz und die Anzahl an Läufen pro 24-Stunden-Intervall während der Plateauphase im komplexen Laufrad.

In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe konnten auch nach 30 Wochen mit derselben eisenreduzierten Diät unveränderte Hämatokrit- und Hämoglobinwerte gemessen werden (Dowling et al. 2009). Eine Anämie als primäre Ursache der verminderten Laufleistung ist demnach unwahrscheinlich. Ein signifikantes Absinken der Eisenkonzentrationen im ZNS wurde bei eisendefizienten C57Bl6n-Mäusen aber bereits innerhalb von 5 Wochen beschrieben (Morse et al. 1999). Das Fehlen von Eisen als Co-Enzym im ZNS führt über eine Reduktion der Tyrosinhydroxylase-Aktivität zu einer Beeinträchtigung der Dopaminsynthese und konsekutiv zu Veränderungen der Dopaminsignalwege (siehe Einleitung: 1.4. Eisen und Dopamin). Erikson und Mitarbeiter (2000), Erikson (2001) und Beard und Mitarbeiter

(2003) konnten im Tierversuch an eisendefizienten Ratten (im Vergleich zu Vergleichstieren mit normaler Diät) eine reduzierte D₁- und D₂-Rezeptordichte im Nucleus accumbens, im Putamen und im limbischen System nachweisen. Eine Beeinträchtigung des dopaminergen mesolimbischen und nigrostriatalen System als Ursache für eine gestörte motorische Aktivität wurde wiederum häufig beschrieben (Mogenson et al. 1980; Alexander et al. 1986; Wise et al. 2004) und bietet eine Erklärung für die Reduktion der motorischen Aktivität unserer Versuchstiere.

Zudem führt Eisenmangel zu einer Reduktion der membranständigen Dopamintransporter (DAT) (Erikson et al. 2000, Beard et al. 2003). Eine Reduktion der verfügbaren DAT, die Dopamin aus dem synaptischen Spalt zurück ins intrazelluläre Zytoplasma transportieren, führt zu einer verminderten Rückresorption und damit zu einer späteren Beendigung des Dopaminsignals (Meiergerd et al. 1993; Dickinson et al. 2002; Zapata et al. 2007). Demnach kann diese Modulation des DAT eine Reduktion der dopaminergen Transmission in Folge verminderter Dopaminrezeptorexpression durch Erhöhung der Dopaminkonzentration im synaptischen Spalt kompensieren (Meiergerd et al. 1993). Dagegen führt eine vermehrte agonistische Bindung am D₂-Rezeptor zu einer Hochregulierung des DAT und damit zu einer Dämpfung des dopaminergen Signals (Meiergerd et al. 1993).

D₃-Defizienz beeinflusste zudem im Vergleich zu D₃^{+/+} die Distanz pro 24-Stunden-Intervall während der Lern- und Plateauphase im komplexen Laufrad und führte zu einer generellen Verstärkung der motorischen Aktivität. Die Hyperaktivität lässt sich dadurch erklären, dass postsynaptische D₃-Rezeptoren einen inhibitorischen Einfluss auf die motorische Aktivität haben (Manzanedo et al. 1999; Ouagazzal und Creese 2000; Pritchard et al. 2003; Milan 2004). So führt die Gabe von D₃-Rezeptoragonisten zu einer verminderten Steigerung der Lokomotion durch Mikroinjektion von Dopamin in den Nucleus accumbens (Ouagazzal und Creese 2000). Khroyan und Mitarbeiter (1997) konnten zudem durch systemische Gabe von D₃-Rezeptoragonisten eine gesteigerte motorischen Aktivität abschwächen. Diese Erkenntnisse und unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Accili und Mitarbeitern (1996), die bei D₃-Knockout-Mäusen eine gesteigerte motorische Aktivität sowohl bei Homozygotie als auch in geringerem Ausmaß bei Heterozygotie beobachten.

4.3 Versuchstiere mit D₃-Defizienz und induziertem Eisenmangel zeigten verzögertes Lernen im komplexen Laufrad

Die Kombination aus negativem Rezeptorstatus (D₃^{-/-}) und Eisendefizienz beeinflusste die relative maximale Geschwindigkeit während der Lernphase im KLR signifikant und führte zu einem verzögerten Erlernen eines neuen Laufmusters. Da die Versuchstiere am Ende der Lernphase die gleiche Leistung erreichen, erscheint die motorische Leistungsfähigkeit ungestört.

Weder der Eisenmangel alleine noch die D₃-Rezeptordefizienz alleine veränderten die Lernkurve im KLR signifikant. Dies ist am ehesten durch einen additiven Effekt der D₃-Defizienz und der mit einem Eisenmangel verbundenen Beeinträchtigung der D₂-Funktion (siehe auch Kapitel 4.2.) auf das motorische Lernen zu erklären.

Der alleinige Eisenmangel beeinträchtigte zwar die motorische Aktivität (signifikante Reduktion der Distanz bei unauffälliger maximaler Geschwindigkeit), jedoch verzögerte er das Erlernen eines neuen Bewegungsmusters im KLR nicht.

Ein negativer Effekt von Eisenmangel auf die Kognition wurde bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen (Logan 1999). Unter anderem konnten Massaro und Widmayer (1981) bei eisendefizienten Mäusen in modifizierten Skinnerboxen (Käfige, die mit Vorrichtungen zur operanten Konditionierung ausgestattet sind) reduzierte kognitive Leistungen im assoziativen und visuellen Lernen nachweisen. Yehuda und Mitarbeiter (1986) konnten bei eisendefizienten Ratten (nach eisenreduzierter Diät für 3 Wochen) Defizite in Wasserlabyrinthversuchen zeigen. Wie in Kapitel 4.2. beschrieben, führt ein Eisenmangel über eine Störung der Tyrosinhydroxylase zu einer verminderten Dopaminproduktion und konsekutiv zu einer verminderten Aktivierung von Dopaminrezeptoren. Diese betrifft auch Strukturen, die am Prozess des motorischen Lernen beteiligt sind (VTA, Nucleus accumbens, Basalganglien). Einen spezifischen Effekt von Eisenmangel auf den D₂-Rezeptor im Sinne einer verminderten D₂-Rezeptordichte im Putamen und im Nucleus accumbens konnte Erikson (2001) in Rattenversuchen nachweisen. In unseren Versuchen führte die Eisendefizienz und die entsprechend der genannten Zusammenhänge zu folgernde Beeinträchtigung der dopaminergen Transmission und der D₂-Rezeptorexpression aber nur bei D₃^{-/-} zu einer Beeinflussung des motorischen Lernen.

Um dieses zu erklären, muss die Bedeutung des D₂- und des D₃-Rezeptors für Lernprozesse betrachtet werden. Im Allgemeinen gelten der D₂- und der D₃-Rezeptor als Gegenspieler bei

Lernprozessen und weiteren kognitiven Funktionen, wobei eine D₂-Aktivierung und D₃-Inhibition den Lernprozess fördern, eine D₂-Inhibition und D₃-Aktivierung hingegen den Lernprozess behindern (Sigala 1997, Sokoloff und Schwartz 1995, Laszy et al. 2004). Bei Colokalisation des D₂- und des D₃-Rezeptors wie im Nucleus accumbens und dem VTA wirkt der D₃-Rezeptor dabei vor allem als inhibitorischer Autorezeptor (Sokoloff und Schwartz 1995). Der D₃-Rezeptor inhibiert über die Hemmung der Freisetzung und Synthese von Dopamin (Tang et al. 1994; O'Hara et al. 1996) die für den Lernprozess fördernde D₂-Aktivierung (Sigala 1997; Diaz et al. 2000; Laszy et al. 2004). Die D₂-Aktivierung mesolimbischer dopaminergener Neurone bewirkt über Stimulation cholinergischer Neurone eine verstärkte Ausschüttung von Acetylcholin im Hippocampus, was zur Konsolidierung von Lerninhalten beiträgt (Hersi et al. 1995; Imperato et al. 1994; Sigala 1997). Sigala (1997) konnte unter Verwendung des D₃-Antagonisten Nafadotride und Laszy und Mitarbeiter (2004) mit zwei weiteren D₃-Antagonisten (U-99194A, SB-277011) im Rattenversuch bestätigen, dass die Inhibition des D₃-Rezeptors und die Stimulierung des D₂-Rezeptors bei intaktem dopaminergen System einen positiven Effekt auf die Konsolidierung des neu Erlernten hat. D₃-Antagonisten konnten dabei in Wasserlabyrinth-Versuchen eine Scopolamin-induzierte Amnesie wieder rückgängig machen.

In unseren Versuchen führte die Defizienz der beiden prinzipiell antagonistischen Rezeptorsysteme (D₂ und D₃) zu additiven Effekten in Bezug auf das motorische Lernen. Dies widerspricht der These eines strikten Antagonismus zwischen D₂ und D₃ (Sigala 1997). Dagegen stehen die Ergebnisse im Einklang mit den Erkenntnissen von Jung und Mitarbeitern (1999), die eine deutlichere Beeinträchtigung der Lokomotion bei D₂- und D₃-Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu D₂-Knockout-Mäusen nachwiesen. Sie schlossen daraus, dass der D₃-Rezeptor als modulatorischer Rezeptor Beeinträchtigungen im D₂-System kompensieren kann (Jung et al. 1999). Mizuno und Mitarbeiter (2007) beobachteten, dass bei D₂-Knockout-Mäusen eine inhibitorische D₂-vermittelte Wirkung auf GABAerge Projektionsneurone durch den D₂/D₃-Agonisten Quinpirol nicht vollständig ausblieb, sondern nur deutlich reduziert wurde. Bei den D₃-Knockout-Mäusen wiederum blieb die stimulatorische D₃-vermittelte Wirkung des Quinpirols im Unterschied dazu vollständig aus. Aus dieser Beobachtung schlossen sie darauf, dass der D₃-Rezeptor sowohl aktivierend als auch D₂-ähnlich inhibierend wirken kann.

Unsere Ergebnisse sind mit der Beobachtung, dass der D₃-Rezeptor abhängig vom Zustand anderer Dopamin-Rezeptoren, des Dopamin-Angebots und des dopaminergen Stoffwechsels

verschiedene Effekte auf die Kognition haben kann, gut vereinbar. In diesem Sinne konnten wir zeigen, dass, obwohl eine Aktivierung des D₃-Rezeptors bei gesunden Mäusen den Lernprozess hemmt (Sigala 1997), ein Fehlen des D₃-Rezeptors bei Eisenmangel und damit einhergehender verminderter Expression von D₂ zu zusätzlichen Lerndefiziten führt. Demnach prädisponiert eine D₃-Rezeptorstörung für durch Eisendefizienz bedingte kognitive Leistungseinbußen.

5. Zusammenfassung

Wir untersuchten die motorische Aktivität und das motorische Lernen in Laufradversuchen bei Mäusen unter Beeinflussung des dopaminergen Systems. Dabei evaluierten wir eine Beeinträchtigung der D₂-Funktion unter Verwendung von D₂-Knockout-Mäusen und nach pharmakologischer Blockade des D₂-Rezeptors sowie eine fehlende D₃-Funktion durch Verwendung von D₃-Knockout-Mäusen mit und ohne Beeinflussung des dopaminergen Systems durch einen diätetisch induzierten Eisenmangel.

Eine Reduktion der D₂-Rezeptor-Funktion in der D₂-Knockout-Maus bzw. nach Injektion des D₂-Rezeptor-Antagonisten Racloprid führte zu einer deutlichen Einschränkung aller Laufrad-Parameter im normalen Laufrad. Die reduzierte Aktivität zeigte sich vor allem in der Anzahl der Läufe und deutlich weniger in einer reduzierten maximalen Geschwindigkeit, was gegen ein rein motorisches Defizit im Sinne eines Parkinsonoids spricht. Da die Verwendung des Laufrads im Gegensatz zu habituellen Bewegungen einen hohen Anteil an Motivation erfordert, ist eine Beeinträchtigung des D₂-Systems an der Schnittstelle zwischen Motivation und Motorik bzw. ein reduzierter Antrieb zu motorischer Aktivität eine Erklärung, die im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen steht. Die Effekte der Racloprid-Injektion waren dosisabhängig und führten zu einer Verschiebung des Aktivitätsmaximums mit vermehrter Laufradaktivität am Ende der Aktivitätsphase. Die zeitlichen Grenzen der Aktivitätsphase wurden durch Racloprid nicht verändert, was einen Dopamin-unabhängigen zirkadianen Schrittmacher nahelegt. Die Ergebnisse demonstrieren die gute Eignung des Laufradmodells zur Untersuchung kurzfristiger pharmakologischer Eingriffe, da durch die hohe zeitliche Auflösung die zeitlich begrenzten Einflüsse des D₂-Antagonisten Racloprid exakt dargestellt werden konnten.

Im zweiten Versuchsabschnitt untersuchten wir die Einflüsse eines Eisenmangels und einer D₃-Rezeptordefizienz auf die motorische Aktivität und das motorische Lernen. Eine eisenreduzierte Diät führte sowohl bei D₃-Rezeptordefizienz als auch bei den Wildtyp-Kontrollen zu einer Reduktion der Gesamtstrecke im 24-Stunden-Intervall bei unveränderter Maximalgeschwindigkeit. Frühere Studien sprechen dabei gegen einen Anämie-induzierten Effekt. Die Kombination aus einem Eisenmangel und dem Fehlen der D₃-Rezeptoren führte zu einer Verzögerung des Erlernens des neuen Laufmusters im KLR, während die einzelnen Defizienzen keinen Einfluss auf die Lernleistung hatten. Insofern kann, obwohl eine Aktivierung des D₃-Rezeptors bei gesunden Mäusen den Lernprozess hemmt, ein Fehlen des D₃-Rezeptors bei gleichzeitig vorliegendem Eisenmangel zu zusätzlichen Lerndefiziten führen.

6. Publikationen

Klinker F, Hasan K, Dowling P, Paulus W, Liebetanz D (2011): Dopamine D(3) receptor deficiency sensitizes mice to iron deficiency-related deficits in motor learning. *Behav Brain Res* 220, 358 – 361

Klinker F, Hasan K, Paulus W, Nitsche W, Liebetanz D (2013): Pharmacological blockade and genetic absence of the dopamine D₂ receptor specifically modulate voluntary locomotor activity in mice. *Behav Brain Res* 242, 117-124

7. Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Überblick über die häufigste Lokalisation der D ₁ - bis D ₅ -Rezeptoren (Missale et al. 1998)	S. 4
Tabelle 2	Verwendete Parameter	S. 12
Tabelle 3	Bindungskapazitäten von Racloprid	S. 14
Tabelle 4	Ergebnis der Messwiederholungs-ANOVA: D ₂ ^{-/-} vs D ₂ ^{+/+}	S. 17
Tabelle 5	Ergebnis der Messwiederholungs-ANOVA: intraperitoneale Injektionen mit RCP	S. 22
Tabelle 6	Ergebnis der Messwiederholungs-ANOVA: subkutane Injektionen mit RCP	S. 23
Tabelle 7	Ergebnis der Messwiederholungs-ANOVA: Eisendefizienz und negativer D ₃ -Rezeptorstatus im KLR	S. 27

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Vereinfachte Darstellung des dopaminergen Zusammenwirkens beim motorischen Lernen	S. 2
Abb. 2	Chemische Reaktion von L-Tyrosin zu L-DOPA, der Vorstufe zu Dopamin	S. 8
Abb. 3	Einfluss einer D ₂ -Defizienz (D ₂ ^{-/-}) auf die motorische Aktivität	S. 16
Abb. 4	Intraperitoneale Injektionen von RCP	S. 19
Abb. 5	Subkutane Injektionen von RCP	S. 19
Abb. 6,7	Intraperitoneale Injektionen von RCP: stündliche Intervalle	S. 20
Abb. 8, 9	Subkutane Injektionen von RCP: stündliche Intervalle	S. 21
Abb. 10	Lernkurven im KLR anhand der V _{max} %	S. 25
Abb. 11	Distanz pro 24-Stunden-Intervall im KLR	S. 26
Abb. 12	Zeit pro 24-Stunden-Intervall im KLR	S. 26

7.3 Tabellarische Zusammenstellung der Posthoc-t-Tests des Kapitels

3.1.2

7.3.1 Intraperitoneale Applikationen

Post-hoc-t-Test	Dist _{sum}		Dist _{mean}		T _{mean}	
	P < 0,05	P < 0,001	P < 0,05	P < 0,001	P < 0,05	P < 0,001
1. Injektion						
Plc vs Rcp3			22 h			
Rcp1,5 vs Rcp3						23 h
2. Injektion						
Plc vs Rcp3	2 h, 3 h	23 h -1 h				
Rcp1,5 vs Rcp3	3 h					
3. Injektion						
Plc vs Rcp1,5	24 h	22 h, 23 h				
Plc vs Rcp3		22 h -3 h		2 h, 3 h		3 h
Rcp1,5 vs Rcp3	2 h, 3 h	1 h			4 h	

7.3.2 Subkutane Applikationen

Post-hoc-t-Test Stündl. Signifikanzen	Dist _{sum}		Dist _{mean}		T _{mean}	
	P < 0,05	P < 0,001	P < 0,05	P < 0,001	P < 0,05	P < 0,001
1. Injektion						
Plc vs Rcp3	23 h, 24 h	1 h				
Plc vs Rcp5	22 h	23 h - 4 h	3 h		22 h	
Rcp3 vs Rcp5		2 h - 4 h	2 h		2 h	
2. Injektion						
Plc vs Rcp3	24 h					
Plc vs Rcp5	22 h, 23 h, 4 h	1 h - 3 h				
Rcp3 vs Rcp5	1 h, 4 h, 5 h	2 h, 3 h			1 h	
3. Injektion						
Plc vs Rcp3	23 h, 24 h, 2 h	1 h	21 h, 3 h		21 h	4 h
Plc vs Rcp5	23 h, 24 h, 4 h	1 h - 3 h	21 h, 4 h		21 h	4 h
Rcp3 vs Rcp5			2 h		2 h	
Postinjektion						
Plc vs Rcp5	21 h, 22 h					

8. Literaturverzeichnis

- Accili D, Fishburn CS, Drago J, Steiner H, Lachowicz JE, Park BH, Gauda EB, Lee EJ, Cool MH, Sibley DR, Gerfen CR, Westphal H, Fuchs S (1996): A targeted mutation of the D3 dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1945-1949
- Adan RAH, Hillebrand JJG, Danner UN, Cano SC, Kas MJH, Verhagen LAW (2011): Neurobiology driving hyperactivity in activity-based anorexia. *Curr Top Behav Neurosci* 6, 229-250
- Alexander, GE, DeLong MR, Strick PL (1986): Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9, 357-381
- Ashe J, Lungu OV, Basford AT, Lu X (2006) Cortical control of motor sequences. *Current Opinion in Neurobiology* 16, 213-221
- Aukett MA, Parks YA, Scott PH, Wharton BA (1986): Treatment with iron increases weight gain and psychomotor development. *Arch Dis Child* 61, 849-857
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E (1995): Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377, 424-428
- Bandelow B, Schmahl C, Falkai P, Wedekind D (2010): Borderline personality disorder: a dysregulation of the endogenous opioid system? *Psychol Rev* 117, 623-636
- Barbeau A, Jasmin G, Duchastel Y (1963): Biochemistry of Parkinson's disease. *Neurology* 13, 56-58
- Barrett, RJ, White DK, Caul WF (1992): Tolerance, withdrawal, and supersensitivity to dopamine mediated cues in a drug-drug discrimination. *Psychopharmacology (Berl.)* 109, 63-67
- Beard J (2001): Defining iron-deficiency anemia in public health terms: a time for reflection. *Journal of Nutrition* 131, 568S-580S
- Beard J, Erikson KM, Jones BC (2003): Neonatal Iron Deficiency Results in Irreversible Changes in Dopamine Function in Rats. *The Journal of Nutrition* 133, 1174 -1179

- Beck F, Beckmann J (2009): Werden sportmotorisch relevante Handlungs-Effekt-Verknüpfungen über dopaminerge Neuromodulationen vermittelt? Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 60, 26-40
- Beck F, Beckmann J (2010): Die Rolle hippocampaler und striataler Plastizitätsvorgänge für motorisches lernen. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 61, 157-162
- Berridge KC (2000): Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. Neuroscience & Biobehavioral Reviews 24, 173–198
- Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991): Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. Brain Res 564, 203-219
- Calaminus C: Die Rolle von Dopamin bei der Steuerung des flexiblen Verhaltens der Ratte. Naturwiss Diss Stuttgart 2010
- Carlsson A, Lindqvist M (1963): Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-Methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 20, 140-144
- Choi WS, Machida CA, Ronnekleiv OK (1995): Distribution of dopamine D1, D2, and D5 receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis. Brain Res Mol Brain Res 31, 86-94
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK (1993): Molecular diversity of the dopamine receptors. Annu Rev Pharmacol Toxicol 33, 281-307
- Clifford, JJ, Kinsella A, Tighe O, Rubinstein M, Grandy DK, Low MJ, Croke DT, Waddington JL (2001): Comparative, topographically-based evaluation of behavioural phenotype and specification of D(1)-like:D(2) interactions in a line of incipient congenic mice with D(2) dopamine receptor “knockout”. Neuropsychopharmacology 25, 527-536
- Costa RM, Cohen D, Nicoletis MAL (2004): Differential Corticostriatal Plasticity during Fast and Slow Motor Skill Learning in Mice. Current Biology 14, 1124-1134
- Dackis CA, Gold MS (1985): New concepts in cocaine addiction: the dopamine depletion hypothesis. Neurosci Biobehav Rev 9, 469-477
- De la Fuente-Fernández R, Stoessl AJ (2002): The placebo effect in Parkinson’s disease. Trends Neurosci 25, 302-306

- Devlin PF, Kay SA (2001): Circadian photoperception. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 677-694.
- Diaz J, Pilon C, Le Foll B, Gros C, Triller A, Schwartz, J-C, Sokoloff P (2000): Dopamine D3 Receptors Expressed by All Mesencephalic Dopamine Neurons. *The Journal of Neuroscience* 20, 8677-8684.
- Dickinson SD, Sabeti J, Larson GA, Giardina K, Rubinstein M, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ, Gerhardt GA, Zahniser NR (2002): Dopamine D2 Receptor-Deficient Mice Exhibit Decreased Dopamine Transporter Function but No Changes in Dopamine Release in Dorsal Striatum. *Journal of Neurochemistry* 72, 148-156
- Doi M, Yujnovsky I, Hirayama J, Malerba M, Tirotta E, Sassone-Corsi P, Borrelli E (2006): Impaired light masking in dopamine D2 receptor-null mice. *Nature Neuroscience* 9, 732-734
- Dowling P, Klinker F, Amaya F, Paulus W, Liebetanz D (2009): Iron-deficiency sensitizes mice to acute pain stimuli and formalin-induced nociception. *J. Nutr* 139, 2087-2092
- Dowling P, Klinker F, Stadelmann C, Hasan K, Paulus W, Liebetanz D (2011): Dopamine D3 Receptor Specifically Modulates Motor and Sensory Symptoms in Iron-Deficient Mice. *The Journal of Neuroscience* 31, 70
- Drago F, Contarino A, Busà L (1999): The expression of neuropeptide-induced excessive grooming behavior in dopamine D1 and D2 receptor-deficient mice. *European Journal of Pharmacology* 365, 125-131
- Erikson K (2001): Iron deficiency decreases dopamine D1 and D2 receptors in rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 69, 409-418
- Erikson KM, Jones BC, Beard JL (2000): Iron Deficiency Alters Dopamine Transporter Functioning in Rat Striatum. *The Journal of Nutrition* 130, 2831 -2837
- Fischer S, Nitschke MF, Melchert UH, Erdmann C, Born J (2005): Motor Memory Consolidation in Sleep Shapes More Effective Neuronal Representations. *The Journal of Neuroscience* 25, 11248 -11255
- Francis-Williams J, Yule W (1967): The Bayley Infant Scales of Mental and Motor Development. An exploratory study with an English sample. *Dev Med Child Neurol* 9, 391-401

- Gerfen CR (1992): The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 15, 133-139
- Girault JA, Greengard P (2004): The neurobiology of dopamine signaling. *Archives of neurology* 61, 641
- Grantham-McGregor S, Ani C (2001): A Review of Studies on the Effect of Iron Deficiency on Cognitive Development in Children. *The Journal of Nutrition* 131, 649S-668S
- Hersi AI, Rowe W, Gaudreau P, Quirion R (1995): Dopamine D1 receptor ligands modulate cognitive performance and hippocampal acetylcholine release in memory-impaired aged rats. *Neuroscience* 69, 1067-1074
- Hu XT, White FJ (1992): Repeated D1 dopamine receptor agonist administration prevents the development of both D1 and D2 striatal receptor supersensitivity following denervation. *Synapse* 10, 206-216
- Hu XT, White FJ (1994): Loss of D1/D2 dopamine receptor synergisms following repeated administration of D1 or D2 receptor selective antagonists: electrophysiological and behavioral studies. *Synapse* 17, 43-61
- Huntley GW, Morrison JH, Prikhozhan A, Sealfon SC (1992): Localization of multiple dopamine receptor subtype mRNAs in human and monkey motor cortex and striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res* 15, 181-188
- Idjradinata P, Pollitt E (1993): Reversal of developmental delays in iron-deficient anaemic infants treated with iron. *The Lancet* 341, 1-4
- Imperato A, Obinu MC, Dazzi L, Carta G, Mascia MS, Casu MA, Gessa GL (1994): Co-dergocrine (Hydergine) regulates striatal and hippocampal acetylcholine release through D2 receptors. *Neuroreport* 5, 674-676
- Jung MY, Skryabin BV, Arai M, Abbondanzo S, Fu D, Brosius J, Robakis NK, Polites HG, Pintar JE, Schmauss C (1999): Potentiation of the D2 mutant motor phenotype in mice lacking dopamine D2 and D3 receptors. *Neuroscience* 91, 911-924
- Kebabian JW (1992): Multiple dopamine receptors and their implications in medicine. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 5, 514-518

- Kelly MA, Rubinstein M, Phillips TJ, Lessov CN, Burkhart-Kasch S, Zhang G, Bunzow JR, Fang Y, Gerhardt GA, Grandy DK, Low MJ (1998): Locomotor Activity in D2 Dopamine Receptor-Deficient Mice Is Determined by Gene Dosage, Genetic Background, and Developmental Adaptations. *The Journal of Neuroscience* 18, 3470-3479
- Khaldy H, León J, Escames G, Bikjdaouene L, García JJ, Acuña-Castroviejo D (2002): Circadian rhythms of dopamine and dihydroxyphenyl acetic acid in the mouse striatum: effects of pinealectomy and of melatonin treatment. *Neuroendocrinology* 75, 201-208
- Khroyan TV, Fuchs RA, Baker DA, Neisewander JL (1997): Effects of D3-preferring agonists 7-OH-PIPAT and PD-128,907 on motor behaviors and place conditioning. *Behav Pharmacol* 8, 65-74
- Korchounov A, Meyer MF, Krasnianski M (2010): Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation. *J Neural Transm* 117, 1359-1369
- Kritzer MF, Creutz LM (2008): Region and sex differences in constituent dopamine neurons and immunoreactivity for intracellular estrogen and androgen receptors in mesocortical projections in rats. *J. Neurosci* 28, 9525-9535
- Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios JM (1993): Differential visualization of dopamine D2 and D3 receptor sites in rat brain. A comparative study using in situ hybridization histochemistry and ligand binding autoradiography. *Eur. J. Neurosci* 5, 145-153
- Lang AE, Lozano AM (1998): Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med* 339, 1044-1053
- Laszy J, Laszlovszky I, Gyertyán I (2004): Dopamine D3 receptor antagonists improve the learning performance in memory-impaired rats. *Psychopharmacology* 179, 567-575
- Le Moal M, Simon H (1991): Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 71, 155-234
- Le Moine C, Bloch B (1995): D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: Sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* 355, 418-426

- Lévesque 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 USA* 89, 8155-8159
- Liebetanz D, Merkler D (2006): Effects of commissural de- and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Experimental neurology* 202, 217–224
- Lisman JE, Grace AA (2005): The Hippocampal-VTA Loop: Controlling the Entry of Information into Long-Term Memory. *Neuron* 46, 703-713
- Logan S (1999): Commentary: iron deficiency and developmental deficit-the jury is still out. *BMJ* 318, 697-698
- Lozoff B, Brittenham GM, Wolf AW, McClish DK, Kuhnert PM, Jimenez E, Jimenez R, Mora LA, Gomez I, Krauskopf D (1987): Iron Deficiency Anemia and Iron Therapy Effects on Infant Developmental Test Performance. *Pediatrics* 79, 981-995
- Lozoff B, Beard J, Connor J, Felt B, Georgieff M, Schallert T (2006): Long-Lasting Neural and Behavioral Effects of Iron Deficiency in Infancy. *Nutr Rev* 64, 34-91
- Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E (1997): Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 388, 586-589
- Manzanedo C, Aguilar MA, Miñarro J (1999): The effects of dopamine D2 and D3 antagonists on spontaneous motor activity and morphine-induced hyperactivity in male mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 143, 82-88
- Massaro T, Widmayer P (1981): The effect of iron deficiency on cognitive performance in the rat. *The American Journal of Clinical Nutrition* 34, 864 -870
- Meiergerd SM, Patterson TA, Schenk JO (1993): D2 receptors may modulate the function of the striatal transporter for dopamine: kinetic evidence from studies in vitro and in vivo. *J Neurochem* 61, 764-767
- Millan M, Seguin L, Gobert A, Cussac D, Brocco M (2004): The role of dopamine D3 compared with D2 receptors in the control of locomotor activity: a combined behavioural and neurochemical analysis with novel, selective antagonists in rats. *Psychopharmacology* 174, 341-357

- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998): Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 78, 189 -225
- Mizuno T, Schmauss C, Rayport S (2007): Distinct roles of presynaptic dopamine receptors in the differential modulation of the intrinsic synapses of medium-spiny neurons in the nucleus accumbens. *BMC Neurosci* 8, 8
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980): From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14, 69–97
- Morley R, Abbott R, Fairweather-Tait S, MacFadyen U, Stephenson T, Lucas A (1999): Iron fortified follow on formula from 9 to 18 months improves iron status but not development or growth: a randomised trial. *Arch Dis Child* 81, 247-252
- Morse AC, Beard JL, Jones BC (1999): A genetic developmental model of iron deficiency: biological aspects. *Proc Soc Exp Biol Med* 220, 147-152
- Mortimer JA, Pirozzolo FJ, Hansch EC, Webster DD (1982): Relationship of motor symptoms to intellectual deficits in Parkinson disease. *Neurology* 32, 133-137
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S (1964): Tyrosine Hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* 239, 2910-2917
- O'Hara CM, Uhland-Smith A, O'Malley KL, Todd RD (1996) Inhibition of dopamine synthesis by dopamine D2 and D3 but not D4 receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 277, 186-192
- Onali P, Schwartz JP, Costa E (1981): Dopaminergic modulation of adenylate cyclase stimulation by vasoactive intestinal peptide in anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 6531-6534
- Orban P, Peigneux P, Lungu O, Albouy G, Breton E, Laberenne F, Benali H, Maquet P, Doyon J (2010): The multifaceted nature of the relationship between performance and brain activity in motor sequence learning. *NeuroImage* 49, 694-702
- Ouagazzal AM, Creese I (2000): Intra-accumbens infusion of D(3) receptor agonists reduces spontaneous and dopamine-induced locomotion. *Pharmacol Biochem Behav* 67, 637-645
- Pirozzolo FJ, Hansch EC, Mortimer JA, Webster DD, Kuskowski MA (1982): Dementia in Parkinson disease: a neuropsychological analysis. *Brain Cogn* 1, 71-83

- Pollitt E (1993): Iron deficiency and cognitive function. *Annu Rev Nutr* 13, 521-537
- Pritchard LM, Logue AD, Hayes S, Welge JA, Xu M, Zhang J, Berger SP, Richtand NM (2003): 7-OH-DPAT and PD 128907 selectively activate the D3 dopamine receptor in a novel environment. *Neuropsychopharmacology* 28, 100-107
- Rao R, Tkac I, Townsend EL, Gruetter R, Georgieff MK (2003): Perinatal Iron Deficiency Alters the Neurochemical Profile of the Developing Rat Hippocampus. *The Journal of Nutrition* 133, 3215 -3221
- Riederer P, Laux G, Pödlinger W. *Neuro-Psychopharmaka: Ein Therapie-Handbuch: Band 4: Neuroleptika. 2. Auflage; Springer Verlag, Wien1998*
- Roncagliolo M, Garrido M, Walter T, Peirano P, Lozoff B (1998): Evidence of altered central nervous system development in infants with iron deficiency anemia at 6 mo: delayed maturation of auditory brainstem responses. *Am J Clin Nutr* 68, 683-690
- Rusak B, Zucker I (1979): Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev* 59, 449-526
- Schultz W, Dayan P, Montague PR (1997): A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275, 1593-1599
- Schultz W, Preuschoff K, Camerer C, Hsu M, Fiorillo CD, Tobler PN, Bossaerts P (2008): Explicit neural signals reflecting reward uncertainty. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 3801-3811
- Schwartz A, Rosenberg G, Spencer A, Barbeau A, Mars H, Libman I (1972): The effects of levodopa therapy in patients with Parkinson's disease. I. Clinical response. *Can Med Assoc J* 107, 973-976
- Sigala S (1997): Opposite effects of dopamine D2 and D3 receptors on learning and memory in the rat. *European Journal of Pharmacology* 336, 107-112
- Simonen RL, Rankinen T, Pérusse L, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C (2003): A dopamine D2 receptor gene polymorphism and physical activity in two family studies. *Physiol Behav* 78, 751-757
- Sokoloff P, Schwartz JC (1995): Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends in pharmacological sciences* 16, 270-275

- Tang L, Todd RD, O'Malley K (1994): Dopamine D2 and D3 receptors inhibit dopamine release. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270, 475-479
- United Nations: 5th Report on the World Nutrition Situation: Nutrition for Improved Development Outcomes; United Nations System 2004
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000): Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24, 125-132
- Van Rossum JM (1966): The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 160, 492-494
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991): Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350, 610-614
- Volkow ND, Wang GJ, Newcorn J, Telang F, Solanto MV, Fowler JS, Logan J, Ma Y, Schulz K, Pradhan K, Wong C, Swanson JM (2007): Depressed Dopamine Activity in Caudate and Preliminary Evidence of Limbic Involvement in Adults With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 64, 932-940
- Walker MP, Brakefield T, Hobson JA, Stickgold R (2003): Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. *Nature* 425, 616-620
- Walter T (2003): Effect of iron-deficiency anemia on cognitive skills and neuromaturation in infancy and childhood. *Food Nutr Bull* 24, 104-110
- 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 USA* 88, 1859-1863
- Wise RA (2004): Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5, 483-494
- Wise RA (2008): Dopamine and Reward: The Anhedonia Hypothesis 30 years on. *Neurotox Res* 14, 169-183
- Wise RA, Carlezon WA (1994): Attenuation of the locomotor-sensitizing effects of the D2 dopamine agonist bromocriptine by either the D1 antagonist SCH 23390 or the D2 antagonist raclopride. *Synapse* 17, 3, 155-159

- Wong JY, Clifford JJ, Massalas JS, Finkelstein DI, Horne MK, Waddington JL, Drago J (2003): Neurochemical changes in dopamine D1, D3 and D1/D3 receptor knockout mice. *European journal of pharmacology* 472, 39–47
- Xu M, Koeltzow TE, Santiago GT, Moratalla R, Cooper DC, Hu XT, White NM, Graybiel AM, White FJ, Tonegawa S (1997): Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors. *Neuron* 19, 837–848
- Yehuda S, Youdim ME, Mostofsky DI (1986): Brain iron-deficiency causes reduced learning capacity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 25, 141-144
- Youdim MB, Ben-Shachar D, Ashkenazi R, Yehuda S (1983): Brain iron and dopamine receptor function. *Adv. Biochem. Psychopharmacol* 37, 309-321
- Zapata A, Kivell B, Han Y, Javitch JA, Bolan EA, Kuraguntla D, Jaligam V, Oz M, Jayanthi LD, Samuvel DJ, Ramamoorthy S, Shippenberg TS (2007). Regulation of Dopamine Transporter Function and Cell Surface Expression by D3 Dopamine Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 282, 35842-35854