

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio

**Intrastriatale Botulinum-Neurotoxin-A-Applikation im
Hemiparkinson-Modell der Ratte - Funktionelle und
morphologische Untersuchungen**

Dissertation

Zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Alexander, Hawlitschka, geb. am 01.03.1981 in Rostock

aus Rostock

Rostock, 21.12.2011

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Dieter G. Weiss (Institut für Biowissenschaften,
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität
Rostock)

2. Gutachter:

Prof. Dr.med. Andreas Wree (Institut für Anatomie, Medizinische
Fakultät der Universität Rostock)

Datum der Einreichung: 21. Dezember 2011

Datum der Verteidigung: 25. Juni 2012

Erklärung

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
2. Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, 21.12.2011

Alexander Hawlitschka

Inhaltsverzeichnis

ERKLÄRUNG.....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
ZUSAMMENFASSUNG	IX
1. EINLEITUNG	1
1.1. DAS IDIOPATHISCHE PARKINSONSYNDROM.....	1
1.1.1. Die Symptomatik	1
1.1.2. Stadien des idiopathischen Parkinsonsyndroms und Dual Hit Theory	2
1.1.3. Die Rolle des α -Synucleins beim idiopathischen Parkinsonsyndrom.....	4
1.1.3.1. Prioneneigenschaften bei fehlgefaltetem α -Synuclein?.....	4
1.2. EXTRAPYRAMIDALMOTORISCHES SYSTEM, BASALGANGLIEN UND MORBUS PARKINSON	5
1.2.1. Striatum (CPu)	7
1.2.2. Globus pallidus (GP)	8
1.2.3. Nucleus subthalamicus (STN).....	8
1.2.4. Substantia nigra (SN)	8
1.2.5. Verschaltung der Basalganglien und deren Rolle bei dem Morbus Parkinson	8
1.2.6. Die Rolle des cholinergen Systems bei der Parkinsonschen Erkrankung	9
1.3. BOTULINUM(NEURO)TOXIN (BONT).....	11
1.3.1. BoNT und SNARE-Komplex	11
1.3.2. Bisherige Anwendungen von BoNT	13
1.3.3 BoNT-A	13
1.4. BISHERIGE THERAPIEFORMEN DES MORBUS PARKINSON	14
1.4.1. Substitution des fehlenden Dopamins	14
1.4.2. Gabe von Catechol-o-methyltransferasehemmern	15
1.4.3. Behandlung mit Monoaminoxidase-B-Hemmern	16
1.4.4. Operative Läsion bestimmter Kerngebiete	16
1.4.5. Tiefe Hirnstimulation	16
1.4.6. Gentherapie.....	16
1.4.7. Transplantation von katecholaminergen Zellen/ Zellersatztherapie	17
1.4.8. Behandlung des striatalen Hypercholinismus mit systemischer Gabe von Anticholinergika ...	18
1.5. TIERMODELLE DES MORBUS PARKINSON – NUTZEN UND GRENZEN.....	19
1.6. INTRAZEREBRALE BONT-APPLIKATION	20
1.7. FRAGESTELLUNG	20
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1. VERWENDETE TIERE.....	22
2.2. NARKOSE DER TIERE	22
2.3. UNILATERALE LÄSION DER SUBSTANTIA NIGRA.....	22
2.3.1. Prinzip der dopaminergen Deafferenzierung durch 6-Hydroxydopamin	22
2.3.2. Unilaterale Läsion bei Wistar-Ratten durch Injektion von 6-OHDA in das rechte Medial Vorderhirnbündel	23
2.4. INTRAZEREBRALE APPLIKATION VON BONT-A	24
2.4.1. Unilaterale BoNT-A-Injektion.....	24
2.4.2. unilaterale BoNT-A-Injektion nach ipsilateraler 6-OHDA-Läsion der SN.....	25
2.4.3. Bilaterale BoNT-A-Injektion	25
2.5. TÖTUNG DER TIERE UND FIXIERUNG DER GEHIRNE	25
2.6. ANFERTIGUNG VON GEFRIERMIKROTOMSCHNITTEN DER GEHIRNE.....	26
2.7. HISTOCHEMIE	26
2.7.1. AChE-Färbung	26
2.7.2. Nissl-Färbung.....	27

2.8. IMMUNHISTOCHEMIE UND IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN.....	27
2.8.1. Verwendete Antikörper	29
2.9. ELEKTRONENMIKROSKOPIE/ IMMUNOELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	32
2.10. PHARMAKAINDUZIERTE MOTORISCHE VERHALTENSTESTS.....	33
2.10.1. Apomorphinrotationstest	33
2.10.2. Amphetaminrotationstest	34
2.11. NICHTPHARMAKAINDUZIERTE MOTORISCHE VERHALTENSTESTS	35
2.11.1. Zylindertest	35
2.11.2. Accelerod -Test (forcierter motorischer Test).....	36
2.11.3. Open-Field-Test	38
2.11.4. Water Maze.....	41
2.11.5. Radial Maze	42
2.11.6. Elevated Plus Maze.....	44
2.12. STEREOLOGIE.....	45
2.12.1. Zählung sämtlicher Neurone im Striatum	45
2.12.2. Zählung cholinergischer Interneurone im Striatum	45
2.12.3. Volumenbestimmung des Striatums	46
2.12.4. Digitale Analyse der Dichte von BoNT-A induzierten Varikositäten im Striatum	47
2.13. STATISTIK.....	47
3. ERGEBNISSE	48
3.1. BONT-A DOSISFINDUNG BEI RATTEN	48
3.2. PHARMAKAINDUZIERTE MOTORISCHE VERHALTENSTESTS.....	48
3.2.1. Apomorphinrotationstest	48
3.2.1.1. Nur-BoNT-A-behandelte Ratten	48
3.2.1.2. BoNT-A bei 6-OHDA-hemiläsionierten Ratten.....	49
3.2.2. Amphetaminrotationstest	53
3.2.2.1. Nur BoNT-A behandelte Ratten.....	53
3.2.2.2. BoNT-A bei 6-OHDA-hemiläsionierten Ratten.....	54
3.3. NICHT-PHARMAKAINDUZIERTE MOTORISCHE VERHALTENSTESTS.....	56
3.3.1. Zylindertest	56
3.3.1.1. Scheinläsionierte- und schein BoNT-A-behandelte Ratten	56
3.3.2. Accelerod-Test (forcierter motorischer Test).....	58
3.3.2.1. 6-OHDA-läsionierte + BoNT-A-behandelte Ratten.....	58
3.3.2.1. Bilateral BoNT-A-behandelte Ratten.....	60
3.3.3. Testung der spontanen motorischen Aktivität, des Explorationsverhaltens und der Angst mittels des Open Field.....	62
3.3.3.1. Open-Field-Test bei 6-OHDA läsionierten und BoNT-A-behandelten Ratten.....	62
3.3.3.2. Open-Field-Test bei bilateral intrastratial BoNT-A-behandelten Wistar-Ratten.....	63
3.3.3.2.1. Analyse des Angstverhaltens.....	63
3.3.3.2.2. Grooming/ Putzen	65
3.3.3.2.3. Rearing/ Aufrichten.....	65
3.3.4. Testung der Angst und des spontanen motorischen Verhaltens mittels des Elevated Plus Maze	65
3.4.1. Water Maze.....	66
3.4.2. Radial Maze	69
3.5.1. Histochemie	72
3.5.1.1. Nissl-Färbung.....	72
3.5.1.2. AChE-Färbung.....	73
3.5.2. Immunhistochemie	74
3.5.2.1. Immunhistochemische Färbungen gegen ChAT	74
3.5.2.2. Immunhistochemische Färbung gegen TH.....	75
3.5.2.3. Doppelfluoreszenzfärbung gegen TH und ChAT.....	77
3.5.2.4. Immunhistochemische Färbung gegen NeuN	78
3.5.2.5. Iba1- und GFAP- Färbung /Anfärbung gegen Mikroglia und Astrozyten	78

3.5.2.6. GAD-67-Färbung/ Immunhistochemische Färbung gegen GABAerge Strukturen	79
3.5.2.7. Immunhistochemische Färbungen gegen Zytoskelettproteine	80
3.5.2.8. Axonale Wachstumskegel	80
3.5.2.9. Immunhistochemische Färbungen gegen präsynaptische Proteine.....	80
3.5.3. Digitale Analyse der Verteilung von TH-positiven und ChAT-positiven Varikositäten	82
3.5.4. Stereologie/ Auszählung der cholinergen Interneurone im Striatum	84
3.5.5. Stereologie - Bestimmung der Gesamtzahl der Neurone im Striatum.....	84
3.5.6. Stereologie – Volumenbestimmung des Striatums	85
3.5.7. Elektronenmikroskopie.....	86
4. DISKUSSION	87
4.1. DOSISFINDUNG, VERTRÄGLICHKEIT AUSSCHLUSS VON ZYTOTOXIZITÄT	87
4.2. PHARMAKAINDUZIERTES ROTATIONSVERHALTEN	87
4.2.1. Rotationsverhalten bei nur-BoNT-A behandelten Tieren.....	87
4.2.2. Ausbleiben apomorphininduzierter Rotationen im 6-OHDA-Hemiparkinsontiermodell: Ein Beweis für einen Durchbruch oder ein Versagen?	88
4.2.3. Amphetamininduzierte Rotationen bei hemiläsionierten Tieren	91
4.3. NICHTPHARMAKAINDUZIERTER MOTORIKTESTS.....	92
4.4. BOTULINUMTOXIN-A UND KOGNITION	94
4.5. BILATERALE INTRASTRIATALE BONT-A-APPLIKATION UND EMOTION/ ANGSTVERHALTEN	95
4.6. BOTULINUM NEUROTOXIN A INDUZIERTER VARIKOSITÄTEN - EIN ALTER BEKANNTER? - AXONALES BALLOONING ODER RETRACTION BULBS?.....	97
4.7. THERAPEUTISCHES POTENTIAL DER INTRASTRIATALEN BONT-A-APPLIKATION	102
4.8. AUSBLICK	103
5. DANKSAGUNG.....	105
6. LITERATURVERZEICHNIS	I
7. ANHANG.....	XI
7.1. PUFFER/ LÖSUNGEN	XI
7.2. TABELLENANHANG	XII
7.4. PUBLIKATIONEN.....	XXIV
7.4.1. Veröffentlichungen	xxiv
7.4.2. Posterbeiträge und Fachvorträge.....	xxiv

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
6-OHDA	<u>6-Hydroxydopamin</u> (OH = Hydroxygruppe)
ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
AChE	<u>Acetylcholinesterase</u>
BiVs	<u>Botulinum Neurotoxin</u> induzierte <u>Varikositäten</u>
BoNT	<u>Botulinum Neurotoxin</u>
ChAT	<u>Cholinacetyltransferase</u>
COMT	<u>Catechol-o-methyltransferase</u>
CPu	<u>Caudatus-Putamen-Komplex</u> (Striatum eines Nagetiers)
CY2	Carbocyanine-Dye 2
DAB	<u>Diaminobenzidin</u>
ER	<u>Endoplasmatisches Retikulum</u>
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	saures Gliafaserprotein (<u>G</u> lial <u>f</u> ibrillary <u>a</u> cidic <u>p</u> rotein)
GP	<u>Globus pallidus</u>
Gpe	<u>Globus pallidus externus</u>
Gpi	<u>Globus pallidus internus</u>
IPS	<u>idiopathisches Parkinsonsyndrom</u>
KG	<u>Körpergewicht</u>
kDA	Kilodalton
L-Dopa	<u>L-3,4-Dihydroxyphenylalanin</u>
LD50	mittlere letale Dosis
LV	<u>Lateralventrikel</u>
MAO	<u>Monoaminoxidase</u>
MP	<u>Morbus Parkinson</u>
MPTP	<u>1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin</u>
MVB	<u>mediales Vorderhirnbündel</u>
NeuN	<u>neuronaies nukleäres Protein</u>
PBS	Phosphatpufferlösung
PFA	<u>Paraformaldehyd</u>
RT	<u>Raumtemperatur</u>
SN	<u>Substantia nigra</u>
SNAP-25	<u>Synaptosomal-assoziiertes Protein-25</u>
SNARE	soluble <u>N</u> -ethylmaleimide-sensitive factor <u>a</u> ttachment <u>r</u> ecceptor
SNpc	<u>Substantia nigra pars compacta</u>
SNpr	<u>Substantia nigra pars reticulata</u>
STN	<u>Subthalamic nucleus</u>
SV2	<u>Synaptisches Vesikelprotein Typ 2</u>
TH	<u>Tyrosinhydroxylase</u>
VAMP-2	<u>Vesikel Assoziiertes Membranprotein-2</u>

Zusammenfassung

Bisherige Kenntnisse über den Morbus Parkinson (MP) und die Wirkung von Botulinum Neurotoxin A (BoNT-A) lassen die Vermutung zu, dass eine intrastriatale Anwendung von BoNT-A geeignet sein kann, dem pathologischen Hypercholinismus im Striatum bei MP entgegenzuwirken und so eine potentielle neue Therapieform darstellen kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit es möglich ist, BoNT-A intrastriatal in Wistar-Ratten zu injizieren, ohne die Tiere in ihrer Vitalität, Motorik und kognitiven Leistungsfähigkeit wesentlich zu beeinträchtigen. Zum einen war die Frage, ob intrastriatale BoNT-A-Applikation generell das motorische Verhalten und die kognitiven Fähigkeiten verändert. Dazu wurde BoNT-A bilateral in das Striatum injiziert. Es konnte festgestellt werden, dass diese Tiere eine verringerte spontane motorische Aktivität und eine verschlechterte motorische Koordination aufwiesen. Kognitionsdefizite konnten hier nicht festgestellt werden. Desweiteren wiesen diese Tiere eine verminderte Ängstlichkeit auf, was sich bei eventuellen späteren therapeutischen Anwendungen von intrastriatalen BoNT-A-Applikationen positiv auf Depressionen und Angststörungen, die häufig mit MP einhergehen, auswirken könnte.

Zum anderen sollte untersucht werden, ob Ratten, bei denen einseitig ein Parkinsonsyndrom ausgelöst wurde, durch eine intrastriatale BoNT-A-Applikation profitieren. Im 6-OHDA-induzierten Hemiparkinsonmodell der Ratte konnte nach intrastriataler BoNT-A-Behandlung eine Aufhebung des pathologischen apomorphininduzierten Rotationsverhaltens festgestellt werden. Die Zahl amphetamininduzierter Rotationen wurde nicht signifikant beeinflusst. Bei Gabe hoher Dosen BoNT-A konnte eine partielle Wiederangleichung des spontanen linksseitigen und rechtsseitigen Vorderpfotengebrauchs nach vorheriger Rechtspräferenz hemiläsionierter Ratten gemessen werden.

In weiteren nichtpharmakaabhängigen motorischen Verhaltenstests konnten keine Unterschiede zwischen 6-OHDA-hemiläsionierten Ratten, die BoNT-A-behandelt wurden und Tieren, die läsioniert und scheinbehandelt waren, festgestellt werden. Auch zu scheinläsionierten und scheinbehandelten Tieren und gänzlich unbehandelten Tieren gab es hier keine Unterschiede.

Durch histologische, immunhistochemische und stereologische Analysen des Gehirngewebes von Ratten, denen nur einseitig BoNT-A intrastriatal injiziert wurde, konnte nachgewiesen werden, dass die BoNT-A-Applikation zu keinem Untergang von Nervenzellen führt. Gleichzeitig konnten erstmals ChAT-positive als auch TH-positive axonale Aufweitungen in BoNT-A-behandelten Striata beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erhärten die These, dass eine intrastriatale Anwendung von BoNT-A geeignet sein kann auch beim Menschen motorische und mentale Symptome des MP zu therapieren.

1. Einleitung

1.1. Das idiopathische Parkinsonsyndrom

1.1.1. Die Symptomatik

An dem idiopathischen Typus der Parkinsonschen Erkrankung (auch idiopathisches Parkinsonsyndrom (IPS)) leiden weltweit ca. 1-2 % des Teils der Gesamtbevölkerung, der das 60'ste Lebensjahr bereits überschritten hat (Gerlach et al., 2003; Ries et al., 2008; Rijk et al., 1997). Hieraus werden sofort zwei Dinge deutlich:

1. es handelt sich offensichtlich um eine altersabhängige Erkrankung,
2. aufgrund der derzeitigen demografischen Entwicklung in den Industrienationen ist in Zukunft mit einer massiven Steigerung der Erkrankungsfälle und mit einer einhergehenden soziologischen und ökonomischen Belastung der Gesellschaft durch diese Erkrankung zu rechnen. Schon jetzt gibt es in der Bundesrepublik Deutschland ca. 250.000 Erkrankte (Gerlach et al., 2003).

Neben dem idiopathischen Typus des Parkinsonsyndroms gibt es solche Typen, die familiär vererblich sind, vaskuläre, traumatische, entzündliche oder toxische Ursachen haben oder die auf Nebenwirkungen von Neuroleptika beruhen, jedoch mit derselben motorischen Symptomatik einhergehen.

Der Morbus Parkinson (MP) stellt im Allgemeinen ein hypokinetisches Syndrom dar. Dessen Kardinalsymptome zeichnen sich durch Rigor, Tremor, Bradykinese bis Akinese und posturale Instabilität aus - Muskelsteifheit, das Zittern distaler Extremitäten mit ca. 2 bis 3 Hertz bei Ruheposition, Bewegungsarmut und ein unsicherer Gang mit der Neigung zu Stürzen aufgrund des Verlustes der Fähigkeit, den Körper unwillkürlich in der Aufrechten zu halten (Birkmayer und Danielczyk, 1991; Gerlach et al., 2003; Obeso et al., 2010; Rohkamm, 2000). Die Symptomatik des Tremor gab der Erkrankung auch ihren ursprünglichen volkstümlichen Namen „Schüttellähmung“ im Deutschen und „Shaking Palsy“ im Englischen, wobei zu sagen ist, dass dieses Symptom keineswegs bei allen Parkinsonpatienten auftritt, vor allem nicht in der Frühphase. Manche Autoren rechnen auch eine Kamptokormie, eine vornübergebeugte Haltung des Oberkörpers beim stehenden oder gehenden Patienten der Symptomatik des MP zu (Margraf et al., 2010; Oh et al., 2011).

Neuroanatomisch am prominentesten und schon makroskopisch an entsprechenden Querschnitten/ Präparaten des Mittelhirns zu erkennen ist ein Verlust der Pigmentierung im Bereich der Substantia nigra pars compacta (SNpc). Diese ist aufgrund des Neuromelaningehaltes ihrer dopaminergen Neurone beim gesunden Erwachsenen deutlich schwärzlich gefärbt. Das Ausbleichen der SNpc beim IPS ist ein Resultat des Untergangs der

dopaminergen Nervenzellen in diesem Kerngebiet. Eben dieser Insult ist verantwortlich für einen Großteil der motorischen Symptomatik des MP. Allerdings wird diese erstmals bemerkbar, wenn schon 70 – 80% der dopaminergen Neurone in der SNpc abgestorben sind (Marsden, 1992; Lozano et al., 1998; Gerlach et al., 2001).

Auch die mikroskopisch beobachtbaren sogenannten Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten sind ein markantes neuropathologisches Merkmal, das in Neuronen der Substantia nigra (SN) aber auch in anderen Hirnarealen zu beobachten ist (Ferrer, 2011). Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten enthalten hauptsächlich fibrillär akkumuliertes α -Synuclein, Parkin (eine Ubiquitinligase Chung et al., 2001), UCH-L1 (ein Enzym, das Ubiquitinpolymere in einzelne Ubiquitinmoleküle spaltet), Ubiquitin, Neurofilament und nitrierte Proteine.

Der Verlust an dopaminergen Neuronen in der SN führt zu einem Rückgang des striatalen Dopamininputs, wodurch die Funktion sowohl GABAerger Projektions- und Interneurone als auch cholinergischer Interneurone gestört wird. Die daraus resultierende Fehlsteuerung mehrerer Schaltkreise im Basalgangliensystem hat eine vermehrte Aktivierung des medialen Pallidumsegments sowie die beschriebene Bewegungsarmut und allgemeine Verlangsamung von Bewegungsabläufen zur Folge (Obeso et al., 2008).

1.1.2. Stadien des idiopathischen Parkinsonsyndroms und Dual Hit Theory

Trotz der herausragenden Rolle der SN für die Symptomatik des MP ist sie jedoch keinesfalls das erste, einzige und letzte Kerngebiet des Gehirns, das beim IPS betroffen ist. Vielmehr scheint es so zu sein, dass sich je nach Stadium der Krankheit ein neurodegenerativer Prozess vom Hirnstamm bis hinauf in den Kortex ausbreitet und seinen Anfang schon im peripheren Nervensystem nimmt. Auch hat sich in der letzten Dekade die Erkenntnis durchgesetzt, dass das IPS neben dem nigrostriatalen, eine ganze Reihe anderer Systeme im menschlichen Gehirn schädigt (Langston, 2006).

Es ist heute üblich den Verlauf der idiopathischen Parkinsonkrankheit in Stadien einzuteilen, die man als sogenannte Braak-Stages bezeichnet (Braak et al., 2003, 2004, 2008; Hawkes et al., 2007, 2009). So werden insgesamt sechs Stadien des IPS unterschieden: zwei präsymptomatische Phasen, in denen neuronale Einschlusskörperchen erst im dorsalen Vagus Kern und dann auch im Locus coeruleus (Kerngebiete, die sich in der Medulla oblongata bzw. im pontinen Tegmentum befinden) sowie im Bulbus olfactorius nachzuweisen sind. Darauf folgt die dritte Phase mit ersten wahrnehmbaren motorischen Defiziten, hier beobachtet man Lewy-Körperchen auch in der SN und einigen anderen Kerngebieten des Telencephalons wie z. B. der Amygdala. In der vierten, fünften und sechsten Phase nehmen

Einleitung

die motorischen Störungen zu und werden zunehmend auch von Demenz begleitet, wobei die Krankheit in ihr terminales Stadium übergeht und Lewy-Körperchen nun auch im Mesokortex, später im Assoziationskortex und schließlich im primären und sekundären Neokortex zu beobachten sind. D. h., der degenerative Prozess scheint förmlich langsam im Gehirn aufzusteigen und sich auszubreiten.

Auf Braak geht auch die Hypothese zurück, dass Noxen über zwei verschiedene Wege in das zentrale Nervensystem gelangen und dort den sich beständig ausbreitenden neurodegenerativen Prozess initiieren – die so genannte „Dual Hit Theory“. Demnach soll zum einen das enterische Nervensystem als auch die Nasenschleimhaut mit ihren Riechsinneszellen und der Bulbus olfactorius Einfallstor für schädigende Einflüsse sein (Braak et al., 2003, 2004, 2006, 2008, Hawkes et al., 2007, 2009).

So umfasst das erste Stadium nach Braak eine prämotorische Phase, in der motorische Störungen noch gar nicht zu beobachten sind, sondern potentielle Patienten zunächst olfaktorische und vegetative Defizite (Doty et al., 1995; Hawkes und Shephard, 1998; Müller et al., 2002) hier vor allem Verdauungsstörungen/ Beeinträchtigungen der Darmmotilität, sowie Schlafstörungen aufweisen (Obeso et al. 2010). Die Pathogenese im Gehirn nimmt hiernach einen sequentiellen Verlauf, von kaudalen Kerngebieten im Hirnstamm zum Mittelhirn und schließlich bis zu großen Gebieten im Kortex. Weiterhin besagt diese Theorie, dass sich wahrscheinlich Noxen aus der Luft im Schleim der Nasenschleimhaut sammeln und diese zum Einen hier über die Riechsinneszellen in den Bulbus olfactorius hinein gelangen. Zum Anderen erreichen die möglichen Schadstoffe durch das Herunterschlucken des kontaminierten Schleims das enterische Nervensystem des Darms und den Meissnerschen Plexus des Magens und des Ösophagus, beeinträchtigen diese und können gleichzeitig transsynaptisch über den Nervus vagus und/ oder die Nervi splanchnici einen neurodegenerativen Effekt bis in den Hirnstamm hinein vermitteln (Hawkes et al., 2007, 2009; Lebouvier et al., 2009; Obeso et al., 2008, 2010). Es wird postuliert, dass in der prämotorischen Phase bereits Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten in Nervenzellen einiger Kerngebiete nachzuweisen sind. Dies sind der Nucleus olfactorius anterior und/ oder Nervenzellen des enterischen Nervensystems als auch des dorsalen motorischen Vaguskerne, der die präganglionären viszeromotorischen Nervenzellen für die parasympathische Kontrolle der inneren Organe des Brustkorbes und des Abdomens beinhaltet, als auch cervikale Ganglien des Sympathikus. Ebenfalls konnten Braak et al. Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten bzw. α -Synuclein-positive Einschlusskörperchen im Auerbachplexus des Ösophagus und im Meissner Plexus des Magens von Patienten

nachweisen. Meist sind Projektionsneurone mit einem langen dünnen Axon betroffen, das entweder kaum oder gar nicht myelinisiert ist. Die Tatsache, dass man bei Parkinsonpatienten oft Schluckbeschwerden, Übelkeit und Verdauungsprobleme beobachtet, spricht hier für einen Zusammenhang zwischen diesen intrazellulären Veränderungen, den vegetativen Störungen und dem Ausbruch des MP (Hawkes et al., 2007, 2009). So wird vermutet, dass auch die sogenannte Divertikulitis, eine chronische Verstopfungserkrankung des Dickdarms, eine auf der Schädigung des enterischen Nervensystems und des Nucleus dorsalis n. vagi zurückzuführende Erkrankung sein kann (Lebouvier et al., 2009). Lewy-Körperchen wurden auch im Plexus cardiacus gefunden. In anderen Studien konnte ein Verlust an katecholaminergen Nervenfasern im Herzen bei Parkinsonpatienten nachgewiesen werden.

1.1.3. Die Rolle des α -Synucleins beim idiopathischen Parkinsonsyndrom

Eine Schlüsselrolle der Braak'schen Theorie kommt falsch gefaltetem, aggregiertem α -Synuclein zu, einem synaptischen Protein mit Chaperonfunktion für präsynaptische Membranproteine, dessen physiologische Rolle aber nach wie vor nicht vollständig geklärt ist (Burré et al., 2010). Es ist ein Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen, die man bei der postmortalen Analyse der Gehirne von IPS-Patienten in diversen Kerngebieten auffindet. Die Fehlfaltung dieses Proteins zeichnet sich vor allem durch einen übermäßigen Anteil an β -Faltblattstrukturen in seiner räumlichen Organisation aus (Angot und Brundin, 2009; Angot et al., 2010; Ferrer, 2011; Olanow und Prusiner, 2009). Dadurch verliert α -Synuclein seine Eigenschaft membrangebunden zu sein, wird schwerer löslich und schlechter abbaubar. Auch ist seit ca. 15 Jahren bekannt, dass es seltene familiär vererbliche Typen des MP gibt, die entweder auf eine Du- oder Triplikation des Wildtypproteingens oder auf andere seltene Mutationen im Gen für α -Synuclein, die zu dessen Fehlfaltung führen, zurückzuführen sind (Bekris et al., 2010).

1.1.3.1. Prioneneigenschaften bei fehlgefaltetem α -Synuclein?

Bei dem Gros der Patienten mit einem IPS lässt sich falsch gefaltetes α -Synuclein in den Lewy-Körperchen nachweisen, auch ohne dass eine Mutation vorliegt. Seit Kurzem schreibt man falsch gefaltetem α -Synuclein Prioneneigenschaften zu, die es diesem ermöglichen, korrekt gefaltetes α -Synuclein ebenfalls mißzufalten (Olanow und Prusiner, 2009). Es ist bekannt, dass Prionen durch ihre Fehlfaltungen höchst widerstandsfähig gegenüber äußeren Einflüssen wie z. B. Hitze und Proteasen sind. Dies spricht dafür, dass auch abnormes α -Synuclein den Verdauungstrakt des Menschen unbeschadet überstehen könnte. α -Synuclein

kann in den Extrazellularraum gelangen und von hier aus von anderen Zellen aufgenommen werden (Angot und Brundin, 2009; Frost und Diamond, 2010). Falsch gefaltetes α -Synuclein kann über den axonalen Transport innerhalb des Nervensystems in verschiedene Areale gelangen. Die Tatsache, dass Lewy-Körperchen im Auerbachplexus des Ösophagus und im Meissner Plexus des Magens sowie im Bulbus olfactorius gefunden wurden, spricht für einen Beginn der Parkinsonschen Erkrankung im enterischen Nervensystem und/ oder den Riechsinneszellen, indem hier zunächst falsch gefaltetes α -Synuclein entsteht bzw. eindringt (Olanow und Prusiner, 2009). Für die Theorie, dass fehlgefaltetes α -Synuclein von einer Zelle in die andere wandert und dann ebenfalls dort Fehlfaltungen von Proteinen auslöst, spricht auch die Beobachtung, dass man in MP-Patienten, denen man menschliche mesenzephalische Zellen in das Gehirn transplantiert hat, in der Hoffnung, dass diese Zellen die Aufgabe der untergegangenen SN übernehmen, post mortem in diesen transplantierten Neuronen ebenfalls α -Synuclein-positive Einschlusskörperchen aufgefunden hat. Die fremden transplantierten Zellen müssen also praktisch von dem umgebenen kranken Hirngewebe "infiziert" worden sein (Angot et al., 2010; Frost und Diamond, 2010).

Es existiert ebenfalls eine Theorie, dass MP durch Virusinfektionen wie der saisonalen Grippe ausgelöst werden kann (Toovey et al., 2011).

1.2. Extrapyramidalmotorisches System, Basalganglien und Morbus Parkinson

Basalganglien sind Kerngebiete in der Tiefe des Großhirns die eine funktionell einheitliche Ansammlung von Nervenzellen beherbergen.

Unter dem Begriff Extrapyramidalmotorisches System werden eine Reihe von neuronalen Verschaltungsmustern zwischen den sogenannten Basalganglien und den motorischen Kortex- und Thalamusregionen verstanden, die der Bewegungsinitiation und Bewegungsmodulierung dienen. Wie der Name vermuten lässt, gibt es neben dem Extrapyramidalmotorischen System auch ein Pyramidales motorisches System. Auf die Beschreibung des Letzteren wird der Übersichtlichkeit halber verzichtet. Zudem sei darauf hingewiesen, dass eine funktionelle Trennung beider Systeme in letzter Konsequenz nicht möglich, aber für die Lehre und eine übersichtliche anatomische Beschreibung der für diese Arbeit relevanten Verschaltungen durchaus sinnvoll ist. Bei den Basalganglien werde ich mich in meiner Arbeit auf die Substantia nigra, das Striatum (CPU), das sich beim Menschen in den Nucleus caudatus und das Putamen aufteilt, das Pallidum, den Nucleus subthalamicus und den Thalamus beschränken.

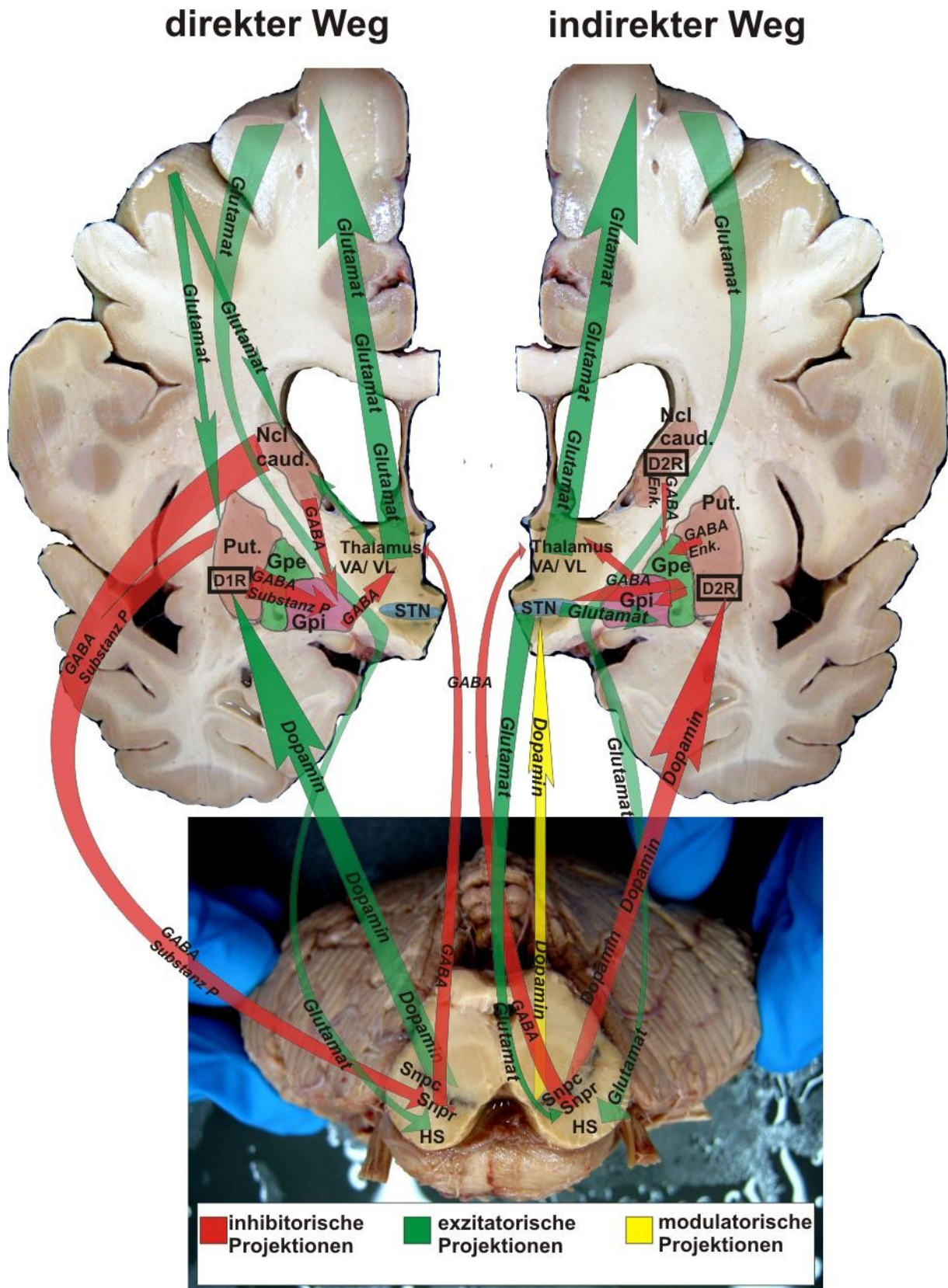


Abbildung 1: Schematische Darstellung der direkten und indirekten motorischen Basalganglien-Neuronenschleifen

Als rote Pfeile sind stets inhibitorische Bahnen dargestellt, als grüne Pfeile exzitatorische Faserbahnen und gelb modulatorische Bahnen. Zu beachten ist, dass die SNpc durch ihre dopaminergen Efferenzen sowohl inhibitorisch auf das CPU, im Falle des indirekten Weges der motorischen Basalganglienschleife, als auch

Einleitung

exzitatorisch, im Falle des direkten Weges, einwirken kann. Dies ist allein durch den unterschiedlichen Besatz bestimmter Kontingente von Neuronen des CPU mit D1- oder D2-Rezeptoren zu erklären. Stets vermittelt eine erhöhte Aktivität der SNpc eine verminderte Aktivität des GPi, wodurch motorische Thalamuskernere vermehrt erregend auf motorische Kortexareale projizieren, die wiederum dann vermehrt erregend über die Bahnen der inneren Kapsel (Faserbahn zwischen Nucleus caudatus und Putamen, als auch zwischen GP und Thalamus) und den Hirnschenkeln auf motorische Kerne des Hirnstamms und des Rückenmarks einwirken.

Das genauere Verständnis des Schemas ergibt sich aus den Darstellungen des Kapitels 1.2.

Die Hirnschnitte und deren Bilder, die dem Schema als Grundlage dienen, wurden im Zuge des Präparierkurses für Medizinstudenten 2011 am Institut für Anatomie Rostock durch Prof. Wree und mich angefertigt. Die obere Teilabbildung zeigt eine gespiegelte Bildmontage aus zwei Frontalschnitten des Telencephalons, da die abgebildeten Kerngebiete in dieser Größe nie auf nur einem Frontalschnitt zu erkennen sind. Die untere Teilabbildung zeigt einen Schnitt durch das Mittelhirn, wobei die ventrale Seite nach unten und die dorsale Seite nach oben zeigt. Deutlich ist hier die schwärzliche Färbung der SNpc zu erkennen.

D1R: Dopaminrezeptortyp 1; D2R: Dopaminrezeptortyp 2; Gpe: Globus pallidus externus; Gpi: Globus pallidus internus; HS: Hirnschenkel; Ncl. caud.: Nucleus caudatus; Put.: Putamen; SNpc: Substantia nigra pars compacta; SNpr: Substantia nigra pars reticulata; STN: Nucleus subthalamicus

1.2.1. Striatum (CPu)

Das Striatum ist bei Säugetieren ein zusammenhängender Kernkomplex, hat sich aber beim Menschen evolutionär in einen Nucleus caudatus und das Putamen getrennt, woraus auch der Name Caudatus-Putamen-Komplex oder im Englischen caudate putamen complex kurz CPu resultiert. Der Nucleus caudatus ist beim Menschen C-förmig wie ein sich nach hinten hin verjüngender Schweif (caudatus = schwanzförmig) um das oval-linsenförmige Putamen (= "Schale") geschwungen und durch Massen grauer Substanz mit ihm zum Teil noch streifenartig (Striatum von lateinisch striatus = streifig) verbunden. Bei der Ratte ist dieser noch zusammenhängende Kernkomplex einem Tropfen ähnlich, der sich von rostral nach caudal hin verjüngt.

Aus dem motorischen, sensorischen und dem präfrontalen Assoziationskortex erhält das Striatum glutamaterge exzitatorische Afferenzen. Die SN projiziert dopaminerg auf das Striatum, wobei diese Projektionen zum Teil inhibitorischen Charakter aufgrund des D2-Rezeptorbesatzes eines Teils der striatalen Neurone, aber auch exzitatorischen Charakter aufgrund des D1-Rezeptorbesatzes anderer striataler Neurone haben. Weiterhin wird das CPu glutamaterg vom Thalamus innerviert (Gerfen et al., 1995). Der Haupttransmitter der Projektionsneurone des CPu ist γ -Amino-Buttersäure (GABA), dieser wirkt stets inhibitorisch. Das CPu wirkt also hemmend auf seine Efferenzgebiete ein. Diese sind die SN und Teile des Globus pallidus (GP). Daneben werden durch das Striatum auch Neuropeptide/Cotransmitter wie Enkephaline, Dynorphine und Substanz P ausgeschüttet (Obeso et al. 2008 a). Desweiteren verfügt das Striatum über cholinerge Interneurone die tonisch Aktionspotentiale ausbilden.

1.2.2. Globus pallidus (GP)

Der GP grenzt unmittelbar medial dem Striatum an und wird anatomisch wie auch funktionell in ein mediales Pallidumsegment, auch Globus pallidus internus (GPi) und ein laterales Pallidumsegment, auch Globus pallidus externus (GPe) unterteilt. Der GP verfügt über spontan aktive Neurone, diese sind GABAerg. Im Allgemeinen spricht man dem lateralen Pallidumsegment zu, bewegungsfördernde Impulse zu senden und dem medialen Pallidumsegment eher hemmend auf die Bewegungsinitiation einzuwirken. Wie oben erwähnt, erhält der GP viele Afferenzen aus dem CPU jedoch auch aus dem Nucleus subthalamicus und dem Thalamus.

Efferent ist der GP mit dem Nc. ventralis anterolateralis des Thalamus und dem Nc. subthalamicus verbunden. Mit letzterem ist der GP reziprok verschaltet.

1.2.3. Nucleus subthalamicus (STN)

Der STN ist sowohl efferent als auch afferent mit dem GP verbunden und er projiziert ebenfalls in den Thalamus. Seine Neurone sind glutamaterg, wodurch er auf seine Zielregion exzitatorisch einwirkt. Ihm ist auch eine eher hemmende Wirkung in der Koordination der Motorik zu Eigen, wobei sich diese eher auf die proximalen Extremitäten beschränken soll. Der STN wird durch das laterale Pallidumsegment gehemmt, er selbst erregt jedoch das mediale Pallidumsegment.

1.2.4. Substantia nigra (SN)

Die SN ist im ventrolateralen Mittelhirn lokalisiert und ventral von den Hirnschenkeln begrenzt. Sie imponiert beim gesunden erwachsenen Menschen durch eine deutliche schwärzliche Färbung. Die SN wird in eine Pars compacta (SNpc) und eine Pars reticulata (SNpr) unterteilt. Die SNpc enthält hauptsächlich dopaminerge Neurone, die in das Striatum projizieren. Ihr ist auch eine deutliche Schwarzfärbung zu Eigen, die auf den Neuromelaningehalt der dortigen Neurone zurückzuführen ist. Dieses ist ein Nebenprodukt des Dopaminstoffwechsels und stellt ein Polymer aus Dopaminmolekülen dar.

1.2.5. Verschaltung der Basalganglien und deren Rolle bei dem Morbus Parkinson

Vereinfachend kann man sagen, dass beim MP zwei übergeordnete Schaltkreise gestört sind. Man spricht hier allgemein von einem "direkten Weg" und einem "indirekten Weg" (**Abb. 1;** Obeso et al., 2008 b). Der indirekte Weg zeichnet sich dadurch aus, dass die SNpc über Dopaminbindung an D2-Rezeptoren die Teile des CPU's hemmt, die den

Einleitung

bewegungsfördernden Anteil des GP, nämlich den externen Teil hemmen. Dieser wiederum hemmt den STN und den GPi, die inhibitorisch auf die bewegungsfördernden Teile des Thalamus projizieren. In der Summe hemmt die Aktivität der SN also hier den inneren Teil des Pallidums, gleichzeitig wird sie durch Rückkopplung vom STN aktiviert und moduliert ebenfalls dessen Aktivität (**Abb. 1**).

Beim direkten Weg erregt die SNpc, vermittelt durch D1-Rezeptorbesatz der entsprechenden Zielneurone, die Teile des Striatums, die direkt durch GABAerge Fasern den GPi, also den bewegungshemmenden Teil des Pallidums hemmen. Dieser Teil des Striatums wird ebenfalls über glutamaterge Fasern aus dem Kortex und dem Thalamus aktiviert. Desweiteren wird bei diesem direkten Weg durch das CPu auch die SNpr durch GABAerge Projektionen gehemmt. Die SNpr selbst projiziert ebenfalls GABAerg, also hemmend auf die bewegungsfördernden Teile des Thalamus (**Abb. 1**).

Erwähnt sei hier weiterhin der hyperdirekte Weg, der in Abbildung 1 nicht mit aufgeführt wird. Hier projizieren motorische Regionen des Kortex direkt exzitatorisch auf den STN, der dann Teile des Thalamus inhibiert. Diesem Schaltkreis spricht man zu, überschießende bzw. ungewollte Bewegungen zu unterdrücken (Obeso et al., 2008 a, b).

Beim MP kommt es letzten Endes zu einer Enthemmung des inneren Pallidumteils, was wiederum zu einer viel zu starken Hemmung von thalamokortikalen als auch von hirnstammlokalisierten motorischen Systemen führt. Zurückzuführen ist dies darauf, dass der direkte Schaltkreis geschwächt ist, weil weniger D1-Rezeptor-tragende Neurone des Striatums aktiviert werden und der indirekte Schaltkreis überaktiv wird, weil die tonisch aktiven und D2-Rezeptor-tragenden Neurone des Striatums aufgrund des Dopaminmangels nicht ausreichend gehemmt werden (Obeso et al., 2008 a).

1.2.6. Die Rolle des cholinergen Systems bei der Parkinsonschen Erkrankung

Im Striatum befindet sich eine relativ kleine Zellpopulation großer cholinergischer Interneurone, die 1-2 % der Gesamtzahl der Neurone in diesem Kernkomplex ausmachen. Hierbei handelt es sich um Neurone, die spontan und tonisch Aktionspotentiale ausbilden und in regelmäßigen Abständen Acetylcholin an ihren Efferenzgebieten ausschütten (Pisani et al., 2007; **Abb. 2**). Dies sind hauptsächlich die GABAergen Projektionsneurone des Striatums (**Abb. 1 und 2**). Bei MP-bedingten Verschaltungsstörungen des indirekten Regelkreises der Basalganglien werden durch die fehlende dopaminerge Innervation des Striatums eben jene cholinergischen Interneurone überaktiv (Obeso et al., 2008 b). Diese sind mit D2-Rezeptoren ausgestattet (Gerfen et al., 1995; **Abb. 2**). D2-Rezeptoren sind metabotrope Rezeptoren und vertiefen bei

Einleitung

einer Bindung von Dopamin durch eine G-Protein-vermittelte Signalkaskade das Ruhepotential der jeweiligen Nervenzelle, wirken also inhibitorisch. Geht die dopaminerge Innervation im Zuge der MP schrittweise verloren, kompensieren dies zunächst die afferenten Neurone durch eine Überexpression an D2-Rezeptoren. Schreitet die Krankheit voran, kann der fehlende dopaminerge Input auch durch Vermehrung des Rezeptorbesatzes nicht ausgeglichen werden und die cholinergen Interneurone des Striatums werden funktionell überaktiv (Duvoisin, 1967).

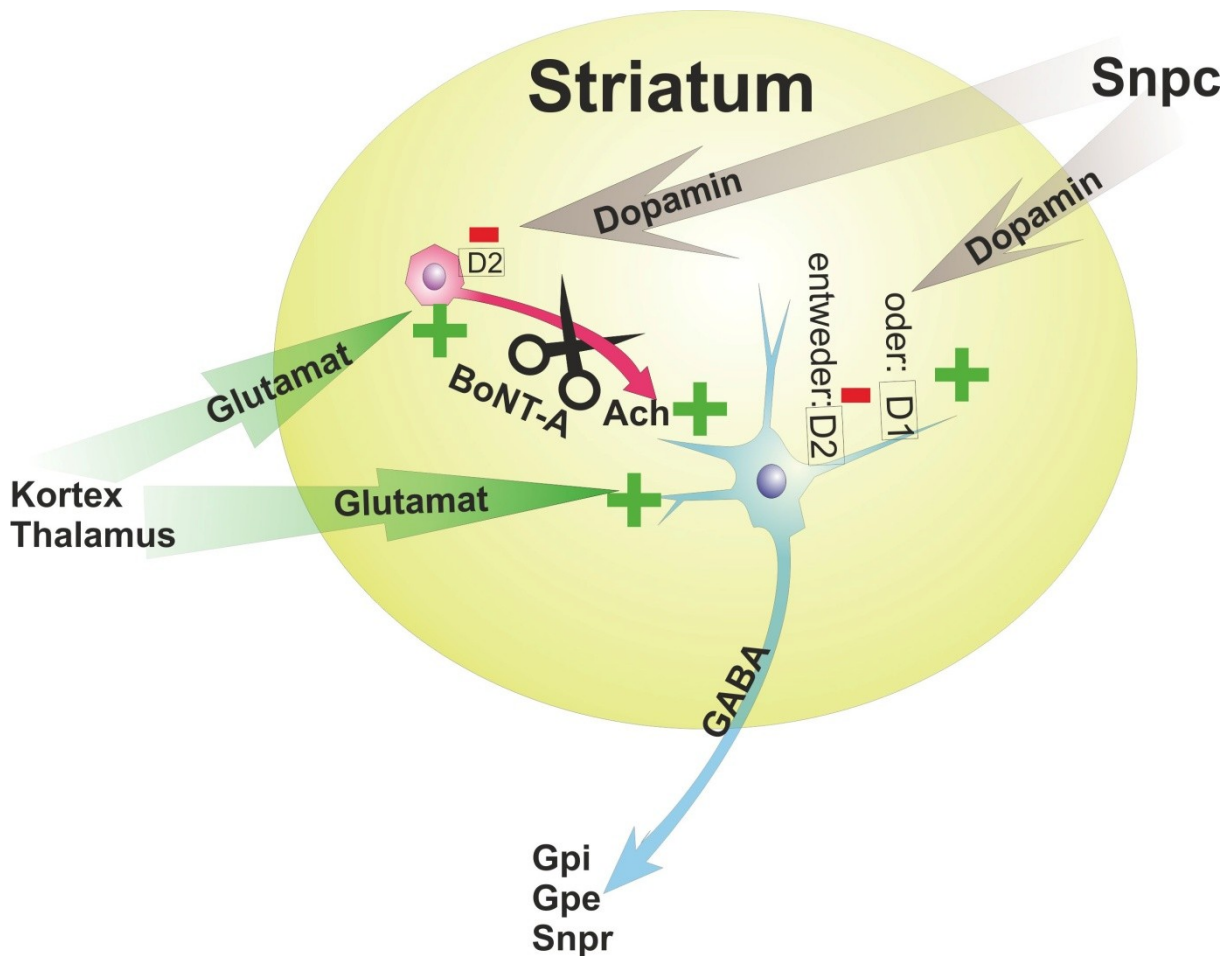


Abbildung 2.: Die Rolle cholinergischer Interneurone im Striatum und die mögliche Einflussnahme durch intrastriale Injektion von BoNT-A

Dopamin wirkt auf ein bestimmtes Kontingent der Neurone des CPU exzitatorisch. Diese Neurone tragen D1-Rezeptoren. Ein anderer Teil der striatalen Nervenzellen trägt D2-Rezeptoren, wird also durch Dopamin inhibiert und ist in den indirekten Weg der Basalganglienschleifen eingeschaltet. Die Erregung der striatalen GABAergen Projektionsneurone jedoch erfolgt nicht nur durch Afferenzen aus anderen Gehirnbereichen sondern zu einem großen Teil auch durch im CPU befindliche cholinerge Interneurone. Diese sind tonisch aktiv und werden durch dopaminerge Afferenzen aus der SNpc gehemmt. Da diese Hemmung beim MP wegfällt, kommt es durch die cholinergen Interneurone zu einer überschießenden Erregung der striatalen GABAergen Projektionsneurone.

BoNT-A ist ein sehr potenter, lang wirkender Blocker der Acetylcholinschüttung. Im Falle einer durch MP verursachten Überaktivität der cholinergen Interneurone müsste intrastrial appliziertes BoNT-A einen pathologisch erhöhten Acetylcholinspiegel wieder auf ein möglichst physiologisches Maß erniedrigen können.

Ein möglicher therapeutischer Eingriff in diese pathogenetisch, bedeutsame Fehlfunktion besteht in einer selektiven und lokal begrenzten Unterdrückung der cholinergen Überaktivität ohne Zerstörung der dafür verantwortlichen Interneurone. Der Eingriff sollte außerdem eine Beeinträchtigung cholinergischer Nerven, die beim MP eine Unterfunktion aufweisen, sowie periphere anticholinerge Wirkungen vermeiden, wie sie mit der derzeitigen anticholinergen Therapie des MP verbunden sind (siehe Abschnitt 1.4.8.). Für diesen Zweck bieten sich Botulinum Neurotoxine (BoNT) an.

1.3. Botulinum(Neuro)toxin (BoNT)

1.3.1. BoNT und SNARE-Komplex

Botulinum Neurotoxine (BoNTs) sind die bekanntesten und stärksten natürlich vorkommenden Neurotoxine. Von ihnen sind bis heute acht Vertreter bekannt (BoNT A, B, C1, C2, D, E, F, G). Sie werden von den verschiedenen Stämmen der Bakterienspezies *Clostridium botulinum* synthetisiert. Es handelt sich hierbei um Gram-positive, anaerobe, stäbchenförmige Bakterien (Montecucco und Schiavo, 1995; Simpson et al., 2008). *Clostridium botulinum* ist aufgrund seiner Fähigkeit Sporen zu bilden besonders widerstandsfähig, weshalb es speziell im Lebensmittelsektor und bei der Futtermittelherstellung (Silage) für Vieh problembereitend sein kann. BoNTs sind der Auslöser des sogenannten Botulismus, bei dem es nach dem Genuss von durch *Clostridium botulinum* verdorbenen, meist luftdicht verschlossenen Lebensmitteln wie z. B. Konserven oder Eingemachtem zu lebensbedrohlichen Lähmungserscheinungen kommt. Nutztiere, vorzugsweise Rinder, erkranken nach der Fütterung mit fehlgegorenen Silagen ebenfalls an Lähmungen (Critchley, 1991).

Botulinumtoxine sind schon seit Langem als potente Blocker von peripheren Nervenendigungen bekannt. Es handelt sich hierbei um Zink-Metallproteasen mit zum Teil unterschiedlichen Zielsubstraten (Coffield und Yan, 2009). Sie binden an verschiedenen Strukturen der präsynaptischen Membran und greifen nach endozytotischer Aufnahme und Spaltung an unterschiedlichen Komponenten des sogenannten SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor)-Komplexes an, der essentiell für die kurzzeitige Fusion der Transmittervesikelmembran mit der präsynaptischen Membran und somit der Transmitterausschüttung ist (Coffield et al., 1994; Fortin et al., 2006; Ishida et al., 2004; Verderio et al., 2006; Williamson et al., 1996) (**Abb. 3**). Das daraus resultierende Unvermögen des Nerventerminus an der motorischen Endplatte Acetylcholin auszuschütten führt zu schlaffen Muskellähmungen.

Einleitung

Der SNARE-Komplex setzt sich aus folgenden drei Proteinen zusammen: dem Synaptosomal-assoziierten Protein-25 (SNAP-25), Syntaxin und Synaptobrevin, das auch als Vesikel Assoziiertes Membranprotein-2 (VAMP-2) bezeichnet wird. BoNT-A und -E spalten SNAP-25, BoNT-B, -D, -G und -F spalten Synaptobrevin und BoNT-C spaltet sowohl SNAP-25 als auch Syntaxin (Brunger et al., 2009; Dolly et al., 2009; Williamson et al., 1996) (**Abb. 3**). Durch *Clostridium botulinum* wird zunächst eine einkettige Vorläuferform des jeweiligen BoNTs synthetisiert, die danach posttranslational in eine leichte Kette (~50 kDa) und eine schwere Kette (~100 kDa) proteolytisch gespalten wird, wodurch das BoNT in seine aktive Form übergeht. Beide Ketten bleiben jedoch nach wie vor durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. BoNTs verfügen über spezifische Bindungsdomänen im C-terminalen Teil ihrer schweren Kette, mit denen sie spezifisch an Ganglioside und Rezeptoren auf der präsynaptischen Membran binden können (Rummel et al., 2007). Diese Rezeptoren sind synaptische Vesikelproteine, für BoNT-A ist es das Synaptische Vesikel Protein Typ 2 (SV2), für BoNT-B und BoNT-G ist es Synaptotagmin I und II (Dong et al., 2003, 2006; Jahn, 2006; Mahrhold et al., 2006; Nishiki et al., 1994, 1996(a), 1996(b); Rummel et al., 2004; Stenmark et al., 2008) (**Abb. 3**). Der N-terminale Teil der schweren Kette vermittelt durch Endozytose die Translokation des jeweiligen gesamten BoNT-Moleküls in Vesikeln durch die präsynaptische Membran. Im Intrazellularraum werden die aufgenommenen Vesikel angesäuert, hierdurch spaltet sich die leichte Kette des BoNTs ab. Die schwere Kette vollzieht eine pH-abhängige Konformationsänderung und bildet eine Pore in der Vesikelmembran, durch die die leichte Kette in das Zytoplasma gelangen kann. Die leichte Kette enthält auch die zinkabhängige metalloendopeptidaseaktive Region, die dann die spezifischen Komponenten des SNARE-Komplexes spaltet (Coesnon et al., 2009; Fischer et al., 2008; Humeau et al., 2000; Schiavo et al., 2000; Verderio et al., 2006).

In Experimenten führte die Spaltung von SNARE-Komponenten durch BoNTs nicht nur zu einer Hemmung der Acetylcholinfreisetzung, auch war die Ausschüttung einiger anderer Neurotransmitter wie Glutamat, Noradrenalin, Glycin, Serotonin und Dopamin aus Synaptosomen beeinträchtigt (Bozzi et al., 2006; Mahrhold et al., 2006). Die Fähigkeit der BoNTs, andere Transmittersysteme außer dem cholinergen zu beeinträchtigen, hängt nachweislich von deren Konzentration (Bigalke et al., 1985) und höchstwahrscheinlich für BoNT-A auch von der präsynaptischen Expression von SV2 ab (Dardou et al., 2011).

1.3.2. Bisherige Anwendungen von BoNT

Botulinumtoxine finden seit ca. drei Dekaden eine breite klinische Anwendung in der Behandlung von Dystonien wie z. B. dem Torticollis, dem sogenannten Schiefhals, Spastiken (Simpson et al. 2008), chronischer Hypersekretion der Speicheldrüsen (Laing et al., 2008; Reid et al., 2008), chronischer Hyperhidrose (Baumann et al., 2005; Naumann et al., 1998; Heckmann et al., 1999, 2005; Vadoud-Seyedi, 2004), Erkrankungen der Blase (Detrusorhyperaktivität) (Chancellor et al., 2008) und für kosmetische Zwecke, wobei eine partielle und transiente Parese bestimmter Anteile der mimischen Gesichtsmuskulatur ausgelöst wird.

Der oder die hyperaktiven Muskeln oder Drüsen werden hierbei in ihrer Funktion ganz oder teilweise ausgeschaltet, indem man entweder direkt in den Muskel oder die Drüse oder in deren direkte Umgebung geringe Mengen an BoNT injiziert und so die Ausschüttung an Acetylcholin durch die sie aktivierenden Nerven blockiert.

1.3.3 BoNT-A

BoNT-A spaltet aufgrund seiner proteolytischen Eigenschaften SNAP-25, welches eine Komponente des SNARE-Komplexes ist. Damit BoNT-A in eine Nervenzelle, im Speziellen in synaptische Endigungen eindringen kann, um intrazellulär wirksam werden zu können, muss dieses an spezifische Rezeptoren binden. Für das BoNT-A handelt es sich bei dem Rezeptor um das Synaptische Vesikel Proteine Typ 2 (SV2) (Dong et al. 2006; Jahn, 2006) (**Abb. 3**). Von ihm sind drei Isotypen bekannt (SV2A, SV2B und SV2C) (Bajjalieh et al., 1992, 1993; Feany et al., 1992; Janz und Südhof, 1999). Sie stellen Glykoproteine dar, die in der Membran von synaptischen Vesikeln verankert sind (Crowder et al., 1999; Janz et al., 1999). Die genaue Funktion von SV2 ist nicht vollständig geklärt, jedoch wird vermutet, dass es eine Rolle bei der Vesikelfusion mit der präsynaptischen Membran spielt (Chang und Südhof, 2009; Lazzell et al., 2004; Schivell et al., 2006). Ihm wird eine modulierende Funktion auf die Vesikelmorphologie nachgesagt (Crowder et al., 1999; Janz et al. 1999; Xu und Bajjalieh, 2001), so dass die Vesikel in der Lage sind unter Kalziumeinfluss eine Exozytose durchzuführen (Chang und Südhof, 2009).

Aufgrund seiner lokal begrenzten Wirkung ist es naheliegend, BoNT-A zur Vermeidung unerwünschter Effekte auf hypocholinerge Regionen des ZNS sowie auf das periphere Nervensystem zu erproben. Damit wird im zweifachen Sinne Neuland betreten:

1. eine bisher nicht beschriebene intrastriatale BoNT-Applikation und
2. ein völlig neuer Therapieansatz für den MP.

Einleitung

Die herkömmlichen experimentellen und etablierten Therapieformen sind noch weit von einer optimalen Beherrschung des Krankheitsgeschehens, insbesondere seiner Progression entfernt.

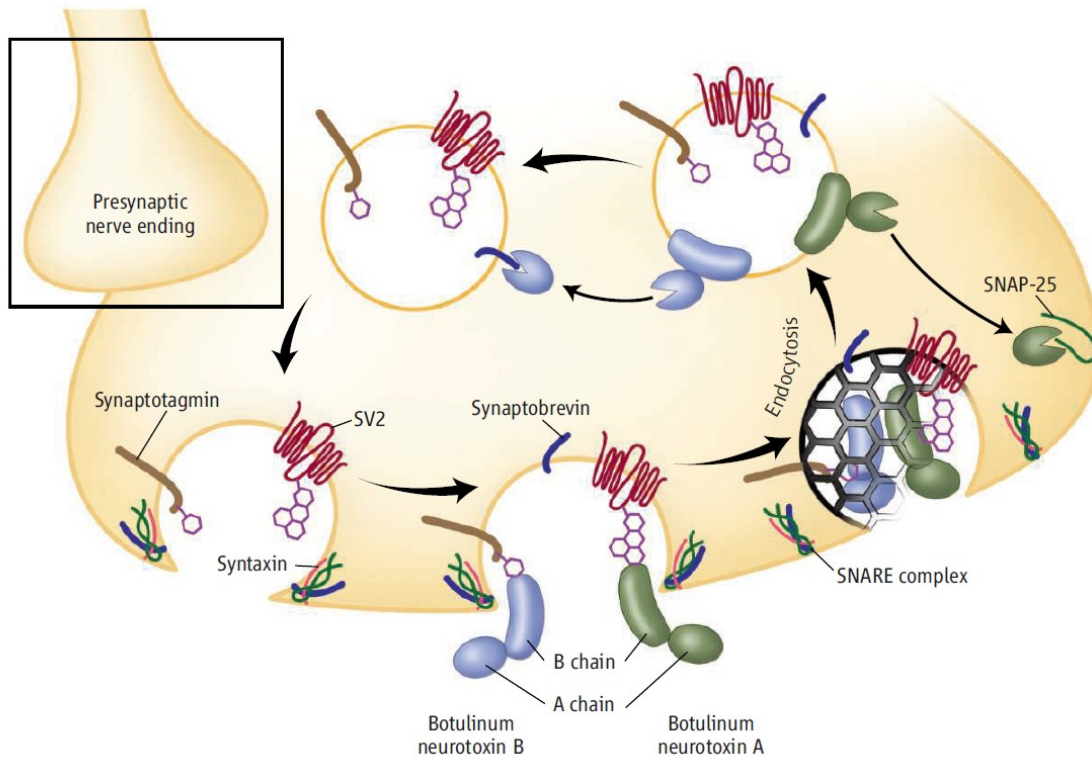


Abbildung 3.: Schema der intrazellulären Aufnahme und Wirkung von BoNT-A und BoNT-B

BoNT-A muss für die endozytische Aufnahme an der präsynaptischen Membran zunächst mit seiner schweren Kette an dem Synaptischen Vesikelprotein Typ 2 binden. Aufgrund einer intrazellulären Ansäuerung des aufgenommenen Vesikels, das BoNT-A enthält, ändert seine schwere Kette die Konformation, lagert sich in die Vesikelmembran ein und schafft einen Kanal, durch den die leichte Kette des BoNT-A in das Zytoplasma der Axonendigung gelangen kann. Hier spaltet sie katalytisch SNAP-25, einen wichtigen Bestandteil des SNARE-Komplexes, der die Fusion von Vesikelmembran und präsynaptischer Membran vermittelt. Durch den Wegfall von intaktem SNAP-25 ist der SNARE-Komplex nicht mehr in der Lage eine Vesikelfusion zu vermitteln, dadurch ist eine Transmitterausschüttung an der betroffenen Synapse nicht mehr möglich.

Aus: Jahn et al. 2006

1.4. Bisherige Therapieformen des Morbus Parkinson

Alle bisherigen geläufigen Therapiestrategien stellen lediglich symptomatische Behandlungen dar und greifen nicht an den Ursachen der zentralen neuronalen Degeneration an (Clark, 2002; Obeso et al., 2008 b; Whitney, 2007).

1.4.1. Substitution des fehlenden Dopamins

Eine der ältesten und bis heute meist angewandten Therapien, sozusagen der Goldstandard in der Behandlung der Symptomatik eines Parkinsonsyndroms, ist die mit L-Dopa (L-3,4-

Dihydroxyphenylalanin, auch Levodopa, Carlsson et al., 1957; Playfer, 1997). L-Dopa ist eine Vorstufe des Dopamins, passiert die Blut-Hirnschranke und wird durch die noch verbleibenden dopaminergen Nervenzellen in der SN sowie durch Gliazellen zu Dopamin umgewandelt. Die wenigen noch überlebenden dopaminergen Nervenzellen in der SN als auch Gliazellen im gesamten Gehirn werden also in die Lage versetzt, mehr Dopamin auszuschütten. In den meisten Fällen wird diese Therapie anfangs gut vertragen und weist eine hohe Wirksamkeit in den ersten Jahren auf. Diese Phase der Krankheit und der Therapie wird oft auch als "Honeymoon-Phase" bezeichnet, da hier eine Behandlung noch relativ einfach, nebenwirkungsarm und erfolgreich möglich ist. Im späteren Verlauf der Krankheit entwickeln die Patienten bei L-Dopa-Behandlung vermehrt Dyskinesien und teilweise auch Dystonien. Auch die Aufhebung der Parkinsonsymptomatik wird zunehmend geringer. Zum Teil ist dies auf den fortschreitenden Verlust der dopaminergen Neurone in der SN zurückzuführen, wodurch das Überangebot an L-DOPA nicht mehr zielgerichtet für eine vermehrte Bereitstellung an Dopamin im Striatum genutzt werden kann.

In den letzten Jahren gibt es auch vermehrt Hinweise darauf, dass L-DOPA selbst einen neurotoxischen Charakter besitzt und den beim MP ablaufenden degenerativen Prozess von dopaminergen Neuronen beschleunigt. Sollte sich dieser Verdacht in Zukunft weiter erhärten, so steht man künftig bei der Therapie des MP vor dem Dilemma abwägen zu müssen, Parkinsonpatienten die bis jetzt beste Möglichkeit für eine lange Zeit ein behinderungsfreies Leben zu führen zukommen zu lassen, aber dadurch ihren Krankheitsverlauf zu beschleunigen oder die Anwendung von L-DOPA hinauszuzögern, zu reduzieren oder sie gar ganz zu unterlassen und den Patienten zum Zwecke eines langsameren Fortschreitens der Krankheit mehr motorische Beeinträchtigungen aufzubürden (Olanow und Obeso, 2011).

Eine ähnliche Wirkung wie L-Dopa bzw. Dopamin üben Dopaminagonisten aus, die ebenfalls als Substitution für die fehlenden dopaminergen Inputs im Striatum aufzufassen sind und eine bedeutende Rolle für die medikamentöse Behandlung des MP spielen.

1.4.2. Gabe von Catechol-o-methyltransferasehemmern

Das Enzym Catechol-o-methyltransferase (COMT) methyliert nahezu im gesamten Organismus Katecholamine und trägt so zu deren Abbau bei, so auch bei Dopamin und L-Dopa. Aus diesem Grund erfolgt eine L-Dopa-Therapie oft in Kombination mit einer COMT-Hemmgabe. So soll die vorzeitige Methylierung und Ausscheidung von L-Dopa verringert und dessen Verfügbarkeit für die Passage durch die Bluthirnschranke gesteigert werden, so dass der Dopaminspiegel im Gehirn möglichst hoch gehalten werden kann (Pahwa, 2006).

1.4.3. Behandlung mit Monoaminoxidase-B-Hemmern

Monoaminoxidase-B (MAO-B) ist vor Allem im Gehirn am Abbau von Katecholaminen beteiligt. Um den Verbleib des bei MP-Patienten verringerten Dopamins in den spezifischen Hirngebieten zu verlängern, werden diese oft mit zentralgängigen MAO-B-Hemmern wie Selegilin und Rasagilin behandelt.

1.4.4. Operative Läsion bestimmter Kerngebiete

Es besteht auch die Möglichkeit die Überaktivität bestimmter Pallidumbereiche und des STN durch operative Zerstörung dieser Hirngebiete auszuschalten. Aufgrund des endgültigen Charakters dieser Therapiemethode ist diese wenig elegant und birgt das Risiko andauernder Folgeschäden.

1.4.5. Tiefe Hirnstimulation

Seit nahezu zwei Dekaden wird bei geeigneten MP-Patienten auch die sogenannte Tiefe Hirnstimulation als Therapie angewandt. Hierbei wird stereotaktisch beidseitig eine Elektrode durch den punktuell eröffneten Schädel in das Gehirn eingeführt, wobei meist der STN oder ein bestimmtes Areal des GPi die zu stimulierende Region und somit das Zielgebiet darstellen. Hier soll durch permanente hochfrequente elektrische Stimulation dieser Kerngebiete ihre pathologische Überaktivität herabgesetzt werden. Die Erfolgsquote dieser Behandlung ist sehr hoch.

Jedoch kommt es durch die notwendige stereotaktische Operation in seltenen Fällen zu schwerwiegenden Komplikationen bis hin zum Tod (Umemura et al., 2003). Die Arbeitsgruppe von Weaver et al. (2009) konnte in einer Studie feststellen, dass es MP-Patienten, die einer Tiefen Hirnstimulation unterzogen worden, bezüglich der motorischen Symptomatik besser ging als solchen, denen man eine optimale Pharmakotherapie zukommen ließ. Allerdings war die Zahl der Komplikationen bei den Patienten mit der Tiefen Hirnstimulation weitaus höher. Mitunter kommt es im Zuge der Tiefen Hirnstimulation auch zu psychopathologischen Erscheinungen, wie Depressionen oder auch Manien und Persönlichkeitsveränderungen. Die Tiefe Hirnstimulation kommt nur für einen relativ kleinen Teil der MP-Patienten in Frage, da es hierfür sehr strikte Ausschlusskriterien gibt.

1.4.6. Gentherapie

Gentherapeutische Versuche zur Behandlung des MP befinden sich gegenwärtig noch im experimentellen Stadium. Mit verschiedenartigen Genkonstrukten wird versucht, an

Einleitung

unterschiedlichen Zielpunkten in das Pathogenesegeschehen des MP einzugreifen. Am vielversprechendsten erscheinen derart Genkonstrukte aus der Glutaminsäure-Decarboxylase und dem Adeno-assoziierten Virus, die durch GABA-Synthese im STN motorische Funktionen verbessern können und deren Effizienz und Ungefährlichkeit kürzlich in einer randomisierten, klinischen Doppelblindstudie an 37 Patienten mit fortgeschrittenem MP nachgewiesen wurde (LeWitt et al. 2011). Hingegen haben kausal orientierte Versuche zur Verminderung der pathologischen Proteinaggregation das präklinische tierexperimentelle Stadium noch nicht verlassen (**Tabelle 1.**).

Tabelle 1.: Experimentelle gentherapeutische Versuche beim MP

Ziel	Gen	Vektor	Hirnregion	Spezies	Referenz
Reduktion pathologischer Proteinaggregate	PARK-2 (Parkin)	Lentivirus	Substantia nigra	Ratte	Lo Bianco et al., 2004
Neuroprotektion und -restauration	Neurturin (GDNF-Homolog)	Adeno-assoziierten Virus	Putamen	Mensch	Marks et al., 2008
Erhöhung der Dopaminsynthese kapazität	Aromatische Aminosäuredecarboxylase (AADC)	Adeno-assoziierten Virus	Putamen	Mensch	Eberling et al., 2008
	AADC + TH + GTP-Cyclohydrolase	Lentivirus	Putamen	Primaten (Macaca fascicularis)	Jarraya et al., 2009
Reduktion der Überaktivität inhibitorischer zum GPi/ SNpr projizierender Neurone im STN	Glutaminsäure-Decarboxylase	Adeno-assoziierten Virus	STN	Mensch	LeWitt et al., 2011

1.4.7. Transplantation von katecholaminergen Zellen/ Zellersatztherapie

Als mögliche Therapieoption wird seit geraumer Zeit die Möglichkeit erforscht fetale oder körpereigene katecholaminerge Zellen in das Gehirn zu transplantieren. Bei Parkinsonpatienten sollen diese Zellen dann die Funktion der untergangenen Neurone der SN übernehmen. Schon seit ca. 20 Jahren werden in klinischen Versuchen katecholaminerge Zellen in das Striatum transplantiert.

Tatsächlich scheinen in Tierversuchen mit Primaten und Nagern transplantierte dopaminerge Neurone im Striatum zu überleben, es zu innervieren und sogar die motorischen Fähigkeiten in Parkinsontiermodellen zu verbessern. Aber in Doppelblindstudien konnten, bis auf Einzelfälle, bei Patienten, denen fetale mesenzepale Zellen aus dem Menschen oder dem

Schwein, bzw. Retinapigmentepithelzellen transplantiert wurden, keine Verbesserungen im Vergleich zu Kontrollindividuen beobachtet werden.

Der Transplantationsprozess wird zwar gut vertragen, doch entwickeln etwa 50% der Patienten auch nach Stop der L-Dopa-Gabe dyskinetische Störungen.

Die postmortale Analyse von Gehirnen, die man einer Transplantation unterzog, zeigte, dass es hier zu Immunreaktionen kommt (aktivierte Mikroglia, T-Zellen und B-Zellen), was eine andauernde Immunsuppression notwendig macht, um das Absterben des Transplantats und die Schädigung des Gehirns durch die Entzündungsreaktion zu verhindern.

Ein weiteres potentiell Problem scheint zu sein, dass die transplantierten Zellen im Gehirn von Parkinsonpatienten ebenfalls beginnen sich pathologisch zu verändern, im Speziellen tauchen in den transplantierten Zellen ebenfalls Lewy-Körperchen auf. Aktuelle Arbeiten deuten darauf hin, dass in den Zelltransplantaten eine Fehlfaltung von α -Synuclein durch das umgebende Gewebe induziert wird (Angot et al., 2010; Frost und Diamond, 2010; Olanow et al. 2009).

1.4.8. Behandlung des striatalen Hypercholinismus mit systemischer Gabe von Anticholinergika

Schon lange, noch vor der Therapieoption mit L-Dopa, umfasste die symptomatische Pharmakotherapie des MP die Anwendung von zentralgängigen Anticholinergika. Im Tierexperiment konnten Schallert et al. (1978) zeigen, dass intraperitoneal injiziertes Atropin in 6-OHDA-läsionierten Ratten die für MP typische Bewegungsarmut aufheben konnte und in Kombination mit L-DOPA zu einer Verringerung von Versteifungen und pathologischen Rotationen im Rotationstest beitragen konnte. Und auch heute noch finden solche Substanzen klinische Anwendung, eine der bekanntesten ist das Piperidinderivat Biperiden (Akineton®). So können Muscarinrezeptorblocker bestimmte Symptome des MP wie den Tremor besonders effektiv lindern (Clarke, 2002). Problematisch bei diesen Präparaten stellen sich aber ihre teils massiven peripheren aber auch zentralen Nebenwirkungen dar wie Mydriasis, Akkomodationsprobleme, Anstieg des Augeninnendrucks, Mundtrockenheit, Entzündungen der Speicheldrüsen, trockene Augen, Muskelschmerzen, Kraftminderung, Veränderungen der Stimme, Schluckstörungen (Dysphagie), eine verminderte Peristaltik der Speiseröhre und damit verbunden Regurgitation, Verstopfung, Harnverhalt, Prostataprobleme, Tachykardie, Fieber bei warmer/ höherer Umgebungstemperatur, Müdigkeit, Schwindel, Halluzinationen, Erinnerungsstörungen und Verwirrtheit (Clarke, 2002; Dassinger et al., 2011; Whitney et al., 2007). Desweiteren wirkt eine systemische anticholinerge Therapie auch nachteilig auf

Teilaspekte der Pathogenese des MP ein, hervorgerufen durch eine weitere Suppression von bei MP hypocholinergen Hirnregionen wie dem Nucleus basalis Meynert und Nucleus pontinopendicularis, was zu Gangstörungen (Bohnen und Albin, 2011) und zu einer Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten bis hin zur Demenz führt (Emre et al., 2004). Diese cholinerge Unterfunktion kann sogar den Einsatz von Cholinesterasehemmern zur Demenzbehandlung (Emre et al., 2004) erfordern, was wiederum MP-Symptome wie Tremor, Übelkeit und Schwindel verstärkt. Das macht deutlich, dass eine lokale, nur im Striatum angreifende anticholinerge Intervention bedeutende Vorteile für eine Therapieoptimierung mit sich bringen würde. Um die sich für diesen Zweck anbietenden intrastriatale BoNT-Applikation zu erproben, sind präklinische Versuche in einem geeigneten Tiermodell unabdingbar.

1.5. Tiermodelle des Morbus Parkinson – Nutzen und Grenzen

Die derzeit verfügbaren Tiermodelle des MP lassen sich in toxin-induzierte und genetische unterteilen (Hisahara und Shimohama, 2011), wobei möglicherweise eine Kombination von beiden der Ätiopathogenese der menschlichen Erkrankung am nächsten kommt und am besten typische pathologische und klinische Aspekte des IPS abbildet (Potashkin et al., 2011). Nager und nichthumane Primate werden am häufigsten verwendet. Unter den für die MP-Induktion verbreitetsten Neurotoxinen MPTP, 6-OHDA, Rotenon, Paraquat und Maneb nimmt 6-OHDA eine dominierende Stellung ein. 6-OHDA-behandelte Ratten stellen das Modell der Wahl für die Erprobung neuer symptomatischer Behandlungsverfahren dar, während sie für krankheitsmodifizierende und neuroprotektive Therapieversuche weniger geeignet sind (Meissner et al., 2011). Die großen Hoffnungen, die in transgene Knockout-Tiere gesetzt wurden, bei denen bekannte Kandidatengene hereditärer MP-Formen entweder überexprimiert, mutiert oder ausgeschaltet wurden, haben sich bisher nicht erfüllt. Insbesondere lassen sie die MP-charakteristische Lewy-Körperchen-Pathologie und Krankheitsprogression vermissen. Aus diesen Gründen wurde für die vorliegende Arbeit das 6-OHDA-induzierte MP-Modell der Ratte gewählt.

1.6. Intrazerebrale BoNT-Applikation

Die Applikation von BoNT in das ZNS wurde erstmals von Benecke et al. (1975) bei der Katze beschrieben. Nach einer längeren Unterbrechung gibt es seit 10 Jahren zunehmend Mitteilungen über intrazerebrale Gaben verschiedener BoNT-Isoformen, überwiegend zu therapeutischen Zwecken, z. B. bei nozizeptiven Schmerzzuständen, Epilepsie und Schlaganfall oder zu grundlegenden Fragestellungen der Rolle cholinergischer Verschaltung im Basalgangliennetzwerk (Übersicht in Hawlitschka et al., 2011). Offen blieb dabei häufig die Dosisabhängigkeit von BoNT-Effekten. Insbesondere für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte intrastriatale BoNT-Applikation lagen keine Angaben über die Dosisverträglichkeit vor. Erst kürzlich erschien eine erste Publikation, in der die Funktion von striatalen Substrukturen für das räumliche Lernen bei Mäusen mit intrastriatalem BoNT-A untersucht wurde (De Leonibus et al., 2011).

1.7. Fragestellung

Die bisherigen Therapieformen des MP zeichnen sich durch zahlreiche Unzulänglichkeiten aus, wie zeitlich begrenzte Wirksamkeit bzw. Anwendbarkeit und teilweise starke unerwünschte Nebenwirkungen. Die Symptomatik des MP beruht zu einem großen Teil auf der Überaktivität von cholinergen Interneuronen im Striatum (**Abb. 2**). BoNT-A ist in der Lage, den Vesikelfusionsapparat von cholinergen Nervenendigungen zu zerstören und damit die Ausschüttung von Acetylcholin über einen Zeitraum von mehreren Monaten zu unterbrechen.

Es ist daher Ziel der vorliegenden Arbeit, in einem geeigneten Tiermodell des MP zu klären, ob und in welchem Dosisbereich BoNT-A intrastriatal appliziert werden kann, ohne die Tiere in ihrer Vitalität, Motorik und kognitiven Leistungsfähigkeit wesentlich zu beeinträchtigen. Für die Untersuchung wurde das in der experimentellen Parkinsonforschung am weitesten verbreitete toxische Tiermodell der Ratte ausgewählt, das durch Injektion von 6-OHDA in das mediale Vorderhirnbündel ausgelöst wird. Die Läsion erfolgte dabei einseitig, um ein dadurch medikamentös auslösbares pathologisches Rotationsverhalten der Hemiparkinson-Ratten nach Gabe von Apomorphin und Amphetamin als Maß für die dopaminerge Deafferenzierung zu verwenden. Der Rotationstest sollte gleichzeitig den erwarteten therapeutischen BoNT-Effekt quantifizierbar machen. Desweiteren ist zu klären, ob und wie lange sich auch die spontanen motorischen Fähigkeiten der einseitig läsierten Ratten nach BoNT-A-Behandlung ändern. Hierfür sind BoNT-behandelte läsierte Tiere mit läsierten scheinbehandelten, scheinläsierten und scheinbehandelten und gänzlich unbehandelten Tieren zu vergleichen.

Einleitung

Die Untersuchungen erfolgten in zunehmenden Zeitabständen über einen Gesamtzeitraum von einem Jahr mittels einer Testpalette, die unterschiedliche motorische Fähigkeiten quantitativ erfasst (Zylindertest, Open-Field-Test und Accelerod-Test). Um zusätzlich den Einfluss der beidseitigen intrastriatalen BoNT-A-Injektion auf das kognitive Leistungsvermögen und emotionale Verhalten beurteilen zu können, sind gesunde Versuchstiere zu behandeln und die motorischen und kognitiven Fähigkeiten mit einer erweiterten Testpalette bestehend aus Accelerod, Open Field, Water Maze, Radial Maze und Elevated Plus Maze zu prüfen.

Mittels histochemischer, immunhistochemischer, stereologischer und elektronenmikroskopischer Methoden soll zudem eruiert werden, ob es im Gehirn der Ratten, denen BoNT-A intrastriatal injiziert wurde, zu morphologischen Veränderungen mit oder ohne Zelluntergängen kommt.

Durch die genannten Untersuchungen soll die Arbeit über die Prüfung eines Therapieeffektes von intrastriatalem BoNT-A für den MP hinaus zum besseren Verständnis der Rolle des cholinergen Systems für die Motorik und die Kognition im Zusammenspiel der Basalganglien beitragen.

2. Material und Methoden

Eine Auflistung aller Puffer, Geräte, Materialien, Chemikalien, Kits und Programme die für diese Arbeit benötigt wurden, findet sich in den **Tabellen 1A, 2A und 3A** des Anhangs.

2.1. Verwendete Tiere

Für alle Experimente wurden stets junge adulte männliche Wistar Ratten (*Rattus norvegicus*) mit einem Körpergewicht von ca. 300 g verwendet. Diese wurden von der Firma Charles River WIGA GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden zu dritt in Kunststoffkäfigen mit Metallgitteraufsätzen gehalten. Die Beleuchtung in dem klimatisiertem Tierstall ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) war durch eine Zeitschaltuhr so reguliert, dass ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus geschaffen wurde. Die Ratten hatten uneingeschränkt Zugang zu Wasser und Nahrung. Sämtliche Versuchstiere wurden gemäß den gesetzlichen Tierschutzbestimmungen und den Auflagen der zuständigen Behörden behandelt.

2.2. Narkose der Tiere

Vor sämtlichen Operationen (Läsionen, Scheinläsionen, Botulinumtoxininjektionen und Scheinbotulinumtoxininjektionen) wurden die Versuchstiere mittels einer Mischung aus Ketamin und Xylazin narkotisiert. Hierfür wurden den Tieren eine Mischung aus Ketamin (50mg/ kg KG) und Xylazin (Rompun®; 4mg/ kg KG) intraperitoneal injiziert.

2.3. Unilaterale Läsion der Substantia nigra

2.3.1. Prinzip der dopaminergen Deafferenzierung durch 6-Hydroxydopamin

Es existieren verschiedene Möglichkeiten der Läsion der SN mittels 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), jedoch ist allen Varianten gemein, dass ein Teil oder alle dopaminerge Neurone in der SNpc durch die intrazerebrale Applikation von 6-OHDA zugrunde gehen. Dies kann entweder stereotaktisch direkt in die SN, in das Striatum oder in das mediale Vorderhirnbündel (MVB) injiziert werden. Im Rahmen unserer Experimente erfolgte die Läsion durch die Gabe in das rechte MVB. (**Abb. 5**)

Bei 6-OHDA handelt es sich um ein Neurotoxin, das dem Dopamin strukturell stark ähnelt, hierdurch wird es von Dopaminrezeptoren erkannt und durch Re-Uptakemechanismen von katecholaminergen Zellen aufgenommen (Gerlach et al., 2003). Hier wird bei dem enzymatischen Abbau ein Hydroxylradikal abgespalten. Dies führt zu einer Störung des Komplex 1 der mitochondrialen Atmungskette, was schließlich zu oxidativem Stress in den

Axonen der dopaminergen Zellen der SN führt, der eine rasche (ca. 24 h), zunehmende retrograde Degeneration zur Folge hat, bis hin zu einem nekrotischen und apoptotischen Zelltod der dopaminergen Nervenzellen in der SN.

2.3.2. Unilaterale Läsion bei Wistar-Ratten durch Injektion von 6-OHDA in das rechte Medial Vorderhirnbündel

Die Läsionen mittels 6-OHDA wurden von A. Wree durchgeführt. Der Kopf der Ratte wurde in einem stereotaktischen Apparat (Kopf®, Tujunga, CA, USA) in der sogenannten „Flat Skull“ Stellung positioniert und fixiert. (Abb. 4) Zum Einen geschah dies durch zwei spezielle Stifte, den „Ear-bars“, die in die Gehörgänge eingeführt wurden und zum Anderen durch eine Klemme für den Oberkiefer, in deren unteren Teil, dem „Tooth-bar“, die oberen zwei Inzisiven eingehakt wurden.

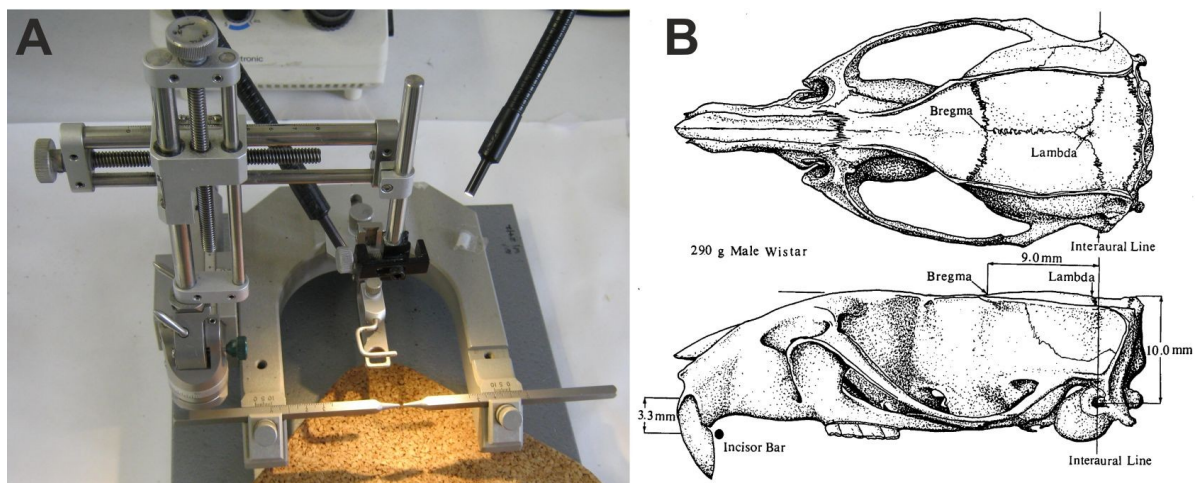


Abbildung 4.: Stereotaxie

A) Aufbau einer Apparatur für stereotaktische Operationen an Ratten. Die narkotisierte Ratte wird mittels eines „tooth-bars“ an den oberen Inzisiven und zweier „Ear-bars“ an den Ohren fixiert. Durch einen sagitalen Schnitt mit einer Rasierklinge wird die Kopfschwarte eröffnet und das Periost nach Spaltung beiseite geschoben. Mittels eines Zahnarztbohrers wird an den entsprechenden Positionen ein Loch in den Schädel gebohrt und mittels einer Hamiltonspritze wird entweder das 6-OHDA oder das BoNT-A an den entsprechenden Koordinaten im Gehirn injiziert.

B) Rattenschädel aus dorsaler und lateraler Ansicht. Die Kreuzung von Kreuznaht und Pfeilnaht des Schädels wird als Bregma bezeichnet. Bregma wurde stets als Koordinatenursprung/ Nullpunkt bei den stereotaktischen Operationen definiert.

B) Abbildung aus Paxinos und Watson (1998).

Bei einer einseitigen Läsion wurden 4 µl einer 0,1 molaren Zitratpufferlösung, die 24 µg 6-OHDA enthielt, über vier Minuten hinweg mittels einer 5 µl -Hamilton-Spritze, wobei Bregma als Referenzpunkt/ Nullpunkt definiert wurde, an folgende Koordinaten injiziert: sagital/ anterior-posterior = -2,3 mm, lateral = -1,5 mm und ventral = -9,0 mm. Vier Wochen

nach Läsion wurde durch den Apomorphinrotationstest (siehe unten) überprüft, ob die Tiere erfolgreich läsiert worden waren. Wies ein Tier mindestens vier Rotationen in der Minute entgegen der läsierten Seite, also entgegen dem Uhrzeigersinn auf, so galt es als erfolgreich läsiert.

Wurden Tiere scheinläsiert, so wurden ihnen an die oben genannten Koordinaten 4 µl der Vehikellösung des 6-OHDA, 0,1 molarer Zitratpuffer, injiziert.

2.4. Intrazerebrale Applikation von BoNT-A

Die BoNT-A-Behandlungen der Versuchstiere wurden von A. Wree und Dr. Mix durchgeführt.

Das komplexproteinfreie BoNT-A wurde in Pulverform von der Firma List Biological Laboratories, INC, über den Händler Quadrantech Diagnostics bezogen. 10 µg wurden zunächst in 200 µl PBS, das 0,1% Bovines Serumalbumin (BSA) als Proteinschutz enthielt, um einen vorzeitigen Zerfall des BoNT-A zu verhindern, gelöst, die so gewonnene Stammlösung wurde aliquotiert und eingefroren bzw. weiterverarbeitet. Am Tag der jeweiligen BoNT-A-Injektion wurden ein oder mehrere Aliquote aufgetaut und weiter gelöst. Die so erstellte Injektionslösung mit der jeweiligen Endkonzentration an BoNT-A wurde kühl und nie länger als einen Tag gelagert.

2.4.1. Unilaterale BoNT-A-Injektion

Für die unilaterale intrastriatale Applikation des BoNT-A wurde der Kopf der Versuchstiere wie für die 6-OHDA-Läsion beschrieben in einem stereotaktischen Apparat fixiert. Die Injektion erfolgte an zwei hintereinander gelegenen Punkten im rechten Striatum die folgende Koordinaten in Bezug auf Bregma hatten (**Abb. 5**):

Injektionsstelle 1: A +1,3 mm, L - 2,6 mm, V -5,5 mm

Injektionsstelle 2: A -0,4 mm, L -3,6 mm, V -5,5 mm

Es wurde an beide Injektionsstellen jeweils 1 µl an BoNT-A-Lösung injiziert, deren Konzentration von der jeweiligen zu applizierenden Menge an BoNT-A abhing. Hierzu wurde die BoNT-A-Lösung in jeder Injektionsstelle über vier Minuten hinweg in Schritten von 0,25 µl in der Minute injiziert. Danach wurde die Injektionskanüle noch vier Minuten an den jeweiligen Koordinaten belassen, um eine ausreichende Diffusion der Lösung zu gewährleisten und einen Rückfluss durch den Injektionskanal zu vermeiden.

Bei Schein-BoNT-A-Injektionen wurde in die entsprechenden Koordinaten im Striatum jeweils nur 1 µl der Vehikellösung injiziert.

2.4.2. unilaterale BoNT-A-Injektion nach ipsilateraler 6-OHDA-Läsion der SN

Sechs Wochen nach erfolgreicher 6-OHDA-Läsion wurden den Ratten, die zu der Tiergruppe der 6-OHDA-läsionierten und botulinumtoxinbehandelten Ratten gehörten, BoNT-A in das rechte Striatum (ipsilateral zur 6-OHDA-Läsion).

2.4.3. Bilaterale BoNT-A-Injektion

Die beidseitige Injektion von BoNT-A erfolgte wie oben beschrieben, die Koordinaten der Injektionsstellen für das rechte Striatum entsprachen den oben Genannten, die Koordinaten für das linke Striatum waren folgende:

Injektionsstelle 1: A +1,3 mm, L 2,6 mm, V -5,5 mm

Injektionsstelle 2: A -0,4 mm, L 3,6 mm, V -5,5 mm

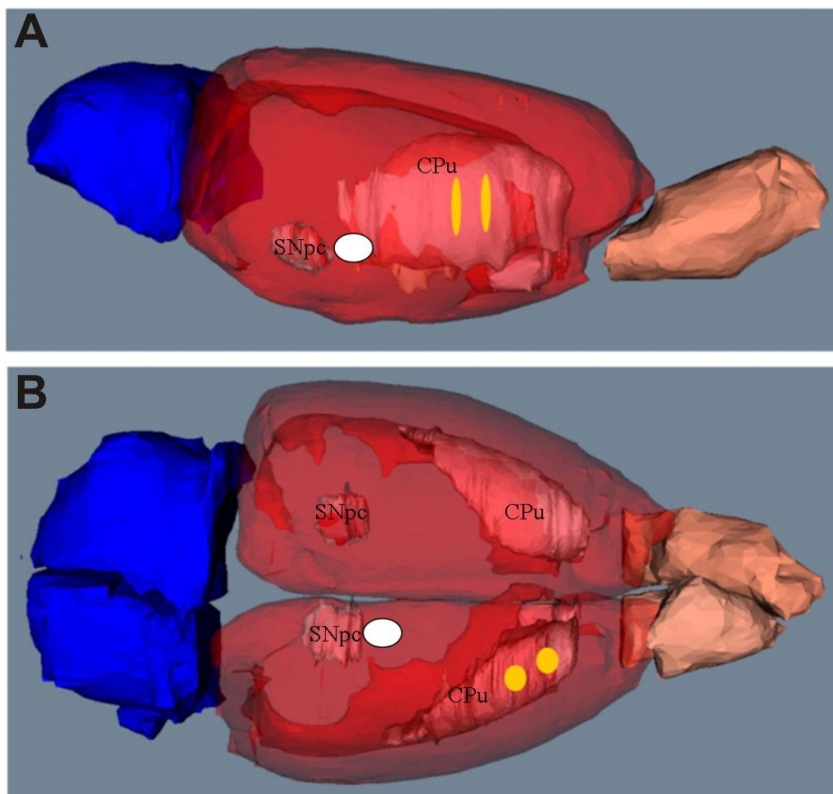


Abbildung 5.: Injektionen von BoNT-A in das CPU sowie von 6-OHDA in das MVB

A) zeigt die laterale Ansicht eines transparenten Rattenhirnmodells, B) zeigt die dorsale Ansicht. Mit einer weißen Ellipse ist die Injektionsstelle für 6-OHDA im medialen Vorderhirnbündel gekennzeichnet. Mit gelben Kreisen bzw. Ellipsen sind die Injektionsstellen für BoNT-A im Striatum markiert.

Legende: SNpc = Substantia nigra pars compacta; CPu = Caudatus-Putamen-Komplex/Striatum

Abbildung zur Verfügung gestellt von Prof. Schmitt, Inst. für Anatomie, Uni-Rostock

2.5. Tötung der Tiere und Fixierung der Gehirne

Die Tiere wurden mittels einer Überdosis an Ketamin und Xylazin getötet, das den Tieren intraperitoneal verabreicht wurde. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und das rechte Herzohr sowie der linke Ventrikel aufgeschnitten. Durch den linken Ventrikel wurde eine stumpfe Glaskanüle in die Aorta eingeführt. Danach wurde der Körperkreislauf zunächst mit 50 ml kalter (ca. 4°C) 0,9%-iger Kochsalzlösung perfundiert, um das gesamte Blut aus

diesem zu spülen, und unmittelbar hiernach wurde der Körperkreislauf mit 300 ml einer kalten Lösung aus PBS (pH 7,4) und 3,7 % Paraformaldehyd perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen und in 3,7%-iger Paraformaldehydlösung (PBS, pH 7,4) über Nacht bei ca. 4°C nachfixiert. Anschließend wurden die Gehirne 24 h bei 4°C in einer Lösung aus PBS und 20% Saccharose entwässert und kryoprotectiert. Schließlich wurden die Gehirne schockgefroren, indem man sie für 5 min in -50°C kaltes Isopentan (Roth) absinken ließ und bei -80°C gelagert.

2.6. Anfertigung von Gefriermikrotomschnitten der Gehirne

Für die immunhistochemische und stereologische Untersuchung der Gehirne wurden von den Gehirnen mittels eines Cryostaten/ Gefriermikrotoms (Leica) für die Immunhistochemie und Histologie 30 µm dicke, für die Elektronenmikroskopie 40 – 50 µm dicke, frontale Parallelschnitte angefertigt. Hierfür wurden die Gehirne mit der Medulla oblongata auf einen speziellen Aluminiumstempel mittels Tissue Freezing Medium® (Jung, Deutschland) ausgerichtet und aufgefroren. Der entsprechende Stempel wurde dann auf dem Objekthalter des Schneidemechanismus des Cryostaten eingespannt und nachjustiert. Jeder siebte Hirnschnitt wurde dabei direkt von der Klinge bzw. vom Präparateauffangtisch direkt auf Super Frost Plus Objektträger (Menzel) aufgenommen und anschließend Nissl-gefärbt. Die restlichen Schnitte wurden mittels eines Pinsels in 48-Well Gewebekulturschalen (Nunc) überführt, die mit Kryoprotektionslösung befüllt waren. Diese Gehirnschnitte wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

2.7. Histochemie

2.7.1. AChE-Färbung

Bei der AChE-Färbung wird die enzymatische Aktivität der Acetylcholinesterase cholinergere Bereiche im Gehirn visualisiert (Karnovsky und Roots, 1964). Die Acetylcholinesterase ist essentiell bei der cholinergen neuronalen Signalweiterleitung, da dieses Enzym durch Spaltung von Acetylcholin in Cholin und einen Essigsäurerest, Acetylcholin, rasch aus dem synaptischen Spalt entfernt. Ohne sie würde es zu einer permanenten Übererregung der postsynaptischen Membranen kommen. Diese Färbung ist bei Weitem nicht so hochauflösend wie eine immunhistochemische Färbung gegen Cholinacetyltransferase, mit der man einzelne Nervenfasern deutlich abgrenzen kann. Dies liegt größten Teils daran, dass Acetylcholinesterase nicht nur in den cholinergen Neuronen lokalisiert ist, sondern auch von anderen Zellpopulationen synthetisiert wird und sich auch im Interzellularbereich befindet.

Für die Färbung wurden die Objektträger mit den darauf befindlichen Hirnschnitten 20 Mal in eine 37°C warme 25%-ige Natriumsulfatlösung (Merck) getaucht. Danach wurden die Präparate in 50 mM Acetatpuffer (pH 5,0), der 10 mM Glycin (Merck), 1,28 mM Kupfer-II-sulfat (Merck) und 2 mM Acetylthiocholinjodid (Serva) enthielt und zu dem kurz vor der Inkubation noch eine 10 mM Ethopropazinstammlösung gegeben wurde, um auf eine Endkonzentration von 0,1mM Ethopropazin zu kommen, gegeben. Hier wurden sie bei 37°C für 100 min inkubiert. Danach wurden die Schnitte vier Mal für jeweils eine Minute in Aqua bidest gewaschen. Sogleich wurden die Schnitte für exakt eine Minute im Dunkeln zur Stabilisation in einer 1%igen Silbernitratlösung inkubiert.

2.7.2. Nissl-Färbung

Um einen Überblick über die Gehirnschnitte, speziell über die Nervenzellmorphologie, zu gewinnen, die Gesamtzahl der Nervenzellen bestimmen zu können und für die stereologische Analyse der immunhistochemisch gefärbten Folgeschnitte eine eindeutige Zuweisung von linker und rechter Hemisphäre zu ermöglichen, wurde stets eine Schnittserie mittels Objektträger direkt vom Objektisch des Cryostaten aufgenommen. Diese wurden einer Nissl-Färbung unterzogen, um vitale Neurone anzufärben. Hier wurden mittels des basischen Farbstoffs Kresylviolettacetat die Zellkerne sowie die sogenannten Nisslschollen angefärbt. Nisslschollen sind nervenzelltypische Lagen aus mehreren Schichten rauhen endoplasmatischen Retikulums (ER). Das Prinzip, das der Färbung zugrunde liegt, ist, dass der basische Farbstoff an die sauren Nukleotide der ribosomalen RNA des ERs und der DNA im Zellkern bindet.

Die Objektträger mit den anhaftenden Gehirnschnitten wurden zunächst für ca. 1 - 2 min drei Mal mit Aqua dest. gespült. Danach ließ man sie abtropfen und inkubierte die Präparate für 30 min in einer Kresylviolettlösung (0,1%) bei 60°C, wobei alle 10 Minuten umgerührt werden musste. Anschließend wurden die Objektträger in Aqua dest. gewaschen, durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Propanol 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) und schließlich vor dem Eindeckeln durch Xylol geführt. Eingedeckelt wurde mit DEPEX (Serva).

2.8. Immunhistochemie und Immunfluoreszenzfärbungen

Der Ablauf der immunhistochemischen Färbungen stellte sich im Allgemeinen wie folgt dar:

Die Inkubations- und Waschschrte bei den immunhistochemischen Färbungen erfolgten in den Kavitäten von 24 Well bzw. 48 Well Gewebekulturschalen (Greiner bio-one), wobei die Gehirnschnitte mit einem Pinsel (da Vinci - Junior Synthetics, Serie 303, Größe 1 und 2)

Material und Methoden

überführt wurden. In eine Kavität wurden ein bis drei Gehirnschnitte überführt, handelte es sich um Anschnitte des Bulbus olfactorius so wurden bis zu 10 Anschnitte in eine Kavität überführt. Waschschriffe, das Abblocken endogener Peroxidasen mit 3%-iger H₂O₂-Lösung und der Färbeschritt mit Diaminobenzidin erfolgten in 24-Well-Platten, wobei jede Kavität mit je 2 ml Waschlösung bzw. 1 ml 3%-iger Wasserstoffperoxidlösung oder Färbelösung befüllt war. Inkubationsschritte mit Proteinabblocklösungen, Antikörperlösungen oder dem ABC-Komplex erfolgten in den 48-Well-Platten, wobei jede Kavität 200 µl - 250 µl der entsprechenden Lösung enthielt.

Am ersten Tag einer Färbung wurden die entsprechenden Gehirnschnitte aus der Cryoprotektionslösung entnommen und zwei Mal in PBS gewaschen. Im Falle von immunhistochemischen Färbungen folgte hierauf ein Abblocken endogener Peroxidasen durch eine Inkubation in einer 3%-igen Wasserstoffperoxidlösung (PBS) für mindestens 15 min, gefolgt von zweimaligem Waschen. Daraufhin wurden unspezifische Bindungsstellen abblockt und die Zellmembranen permeabilisiert, indem man die histologischen Schnitte für mindestens eine Stunde in einer Lösung aus PBS, Triton und spezifischer Seren für mindestens eine Stunde inkubieren ließ. Die Gehirnschnitte überführte man nun in die jeweilige Primärantikörperinkubationslösung, die aus PBS, dem Primärantikörper (**Tabelle 4A**), Triton und Serum bestand. In der Regel erfolgte die Primärantikörperinkubation bei 4°C über Nacht.

Am zweiten Tag der Färbung wurde zwei Mal gewaschen und die Schnitte in die Sekundärantikörperinkubationslösung (**Tabelle 5A**) überführt. In dieser verblieben sie ebenfalls bei 4°C über Nacht.

Am dritten Tag wurde zwei Mal gewaschen und im Falle einer Fluoreszenzimmunhistochemie wurden nun die Schnitte auf Objektträger aufgezogen, auf diesen bei knapp 40°C getrocknet und mit Fluoreszenzeinbettmedium eingedeckelt. Bei immunhistochemischen Färbungen erfolgte die Inkubation in einem Komplex aus Avidin und Biotin, an dem Meerrettichperoxidase gekoppelt war, dem ABC-Komplex aus den jeweiligen Vector®-Kits für ca. 90 min. Hiernach wurde wieder zwei Mal gewaschen, woraufhin die eigentliche Visualisierung in einer Lösung aus PBS, Diaminobenzidin (10 mg/100 ml) und Wasserstoffperoxid (1 µl 35%-ig/ 100 ml) erfolgte. In den meisten Fällen wurde noch Ammoniumnickelsulfat (0,04%) und Ammoniumchlorid (0,004%) zu der Färbelösung hinzugegeben, um durch das Ausfällen von Nickelionen an den Diaminobenzidinpolymeren einen höheren Kontrast zu erzielen. Es wurde wieder gewaschen, die Schnitte wurden auf

Objektträger aufgezogen, auf einer Heizplatte bei ca. 40°C getrocknet, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit DePeX (Serva) eingedeckelt.

2.8.1. Verwendete Antikörper

Eine Auflistung aller verwendeter Primär- und Sekundärantikörper, deren Verdünnungen und Bezugsquellen findet sich in den Tabellen 4A und 5A des Anhangs.

Tyrosinhydroxylase (TH)

Zur immunhistochemischen Darstellung dopaminerger Neurone und Ausläufer wurde ein Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase gewählt. Tyrosinhydroxylase ist streng genommen jedoch nicht nur ein Marker für dopaminerge Strukturen sondern für alle katecholaminergen Strukturen, denn es ist ein Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese. TH fügt an die Aminosäure L-Tyrosin eine weitere Hydroxylgruppe an, so dass L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) entsteht. Durch eine Dekarboxylierung von L-DOPA, vermittelt durch das Enzym DOPA-Dekarboxylase, entsteht der erste Transmitter des Katecholaminmetabolismus, das Dopamin. Aus diesem kann im Folgenden durch Hydroxylierung Noradrenalin und aus diesem durch Methylierung Adrenalin entstehen.

Cholin-Acetyltransferase (ChAT)

Cholinerge Strukturen wurden immunhistochemisch durch Antikörper markiert, die spezifisch gegen Acetylcholintransferase gerichtet waren. Acetylcholintransferase verestert im Zytoplasma Cholin mit einem Essigsäurerest, wodurch der Transmitter Acetylcholin entsteht.

Immunhistochemische Anfärbung gegen Zytoskelleproteine

Aufgrund der beobachteten Auftreibungen an Chat- und TH-positiven axonalen Strukturen waren eventuelle Veränderungen der neuronalen Zytoskellettarchitektur ebenfalls von Interesse, die mittels Anfärbung gegen β -Tubulin, β -III-Tubulin und Neurofillament nachgewiesen werden sollten.

Immunhistochemische Färbungen gegen präsynaptische Proteine

Da wir im Zuge der Analyse der gegen ChAT und TH angefärbten histologischen Präparate von BoNT-A behandelten Striata auf spezifisch angefärbte axonale Aufweitungen gestoßen sind, war es notwendig zu eruieren, ob es sich bei diesen Strukturen um veränderte

Material und Methoden

präsynaptische Strukturen handelt, da BoNT-A die Vesikelfusion an der präsynaptischen Membran blockiert.

Bassoon

Bei Bassoon handelt es sich um ein Zinkfingerprotein, das ebenfalls in der Präsynapse lokalisiert ist. Es vermittelt die Faltung der präsynaptischen Membran und dient der Bereitstellung von synaptischen Vesikeln.

PACSIN 1

PACSIN 1, auch als Syndapin 1 bezeichnet, scheint beim Membrantransport beteiligt zu sein und mit Actinfilament zu interagieren.

SNAP-25

SNAP-25 ist das Substrat des Botulinumtoxin-A und ist Bestandteil des SNARE-Komplexes, der die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran bei einem Aktionspotential vermittelt.

Synapsin-1

Synapsin-1 ist ein Protein, das an der Membran von synaptischen Vesikeln lokalisiert ist und gleichzeitig an Zytoskellettkomponenten der präsynaptischen Membran verankert ist. Es soll die Lokalisation von synaptischen Vesikeln an der präsynaptischen Membran sicherstellen, gleichzeitig soll ein aktionspotentialvermittelter Ca^{2+} -Influx eine Lösung des Synapsin-1 bewirken, wodurch ein Nachrücken neuer gefüllter synaptischer Vesikel nach beendeter synaptischer Signalübertragung möglich ist.

Synaptophysin

Bei Synaptophysin handelt es sich um ein Glykoprotein, das ebenfalls an der Membran von synaptischen Vesikeln lokalisiert ist und mit Synaptobrevin interagieren soll.

Synaptotagmin 1

Synaptotagmin 1 stellt einen Kalziumsensor an synaptischen Vesikeln dar, der mit SNAP-25 interagiert und beteiligt ist an der Regulation der Transmitterfreisetzung.

Syntaxine

Syntaxine sind neben SNAP-25 und Synaptobrevin Bestandteile des sogenannten SNARE-Komplexes, der eine Fusion der Vesikelmembran mit der präsynaptischen Membran vermittelt.

α -Synuclein

α -Synuclein ist ein Protein, das vornehmlich an Synapsen lokalisiert ist und das bei der Organisation des SNARE-Komplexes eine große Rolle zu spielen scheint (Burré et al., 2010). Die vollständige Funktion dieses Proteins ist noch nicht hinlänglich geklärt. Es ist Hauptbestandteil der sogenannten Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten, die sich beim IPS in Nervenzellen des ZNS beobachten lassen.

Vesikulärer Acetylcholintransporter (VAChT)

Nachdem Acetylcholin im Zytoplasma cholinergischer Nervenzellen synthetisiert wurde, wird es durch die vesikulären Acetylcholintransporter in die synaptischen Vesikel transportiert. VAChT's sind an der synaptischen Vesikelmembran an den Axonterminalen der cholinergen Zellen lokalisiert.

VMAT-2

VMAT-2 (Vesikulärer Monoamintransporter 2) dient dem Transport von Monoaminen wie den Transmittern Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin vom Zytoplasma in die präsynaptischen Vesikel.

Glutamic acid decarboxylase 67 (Glutamatdecarboxylase 67, GAD-67)

GABAerge Nervenzellen wurden durch die immunhistochemische Markierung des Enzyms Glutamatdecarboxylase 67 dargestellt. Dies vermittelt die Spaltung von Glutamat in Kohlenstoffdioxid und den Transmitter γ -Aminobuttersäure.

ZnT3

Ist ein Transmembranprotein in synaptischen Vesikeln, das dem Transport von Zinkionen dient (Zinktransporter 3).

Darstellung von axonalen Wachstumskegeln

Um eine eventuelle Neuaussprossung von Axonen in BoNT-A-behandelten Striata nachweisen zu können wurden einige Präparate mit einem kommerziellen Antikörper gegen axonale Wachstumskegel (Acris Antibodies GmbH) markiert.

2.9. Elektronenmikroskopie/ Immunoelektronenmikroskopie

Für die Ultrastrukturanalyse der BoNT-A infiltrierten Gehirne und hier vor allem der von uns aufgefundenen BoNT-A induzierten Varikositäten wurden Gefriermikrotomschnitte, ähnlich wie oben beschrieben immunhistochemisch gegen TH und ChAT angefärbt. Die Gehirne wurden hierfür teilweise 50 µm dick frontal geschnitten. Für einen möglichst guten Erhalt der Ultrastrukturen wurde während der immunhistochemischen Färbungen auf Detergenzien wie Triton X-100 verzichtet, dafür wurde jedoch die Inkubationszeit für den Primärantikörper auf zwei Tage bei 4°C verlängert. Während der Färbung verblieben die Gehirnschnitte in den Kavitäten der Gewebekulturschalen und lediglich die verschiedenen Lösungen und Puffer wurden vorsichtig abpipettiert bzw. hinzugegeben. Die Visualisierung erfolgte wie bei einer Standardimmunhistochemie mittels des ABC-Komplexes aus den jeweiligen Vector®-Kits und der Polymerisierung von DAB, jedoch erfolgte keine Verstärkung mittels Nickelionen. Nach der Färbung wurden die Schnitte in PBS gewaschen und in Cacodylatpuffer (pH 7,6), der 2,5% Glutaraldehyd enthielt, über Nacht fixiert und danach in einer 1%-igen Osmiumtetroxidlösung für 30 Minuten nachfixiert. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurden kleine Bereiche der Hirnschnitte reseziert, die weiter analysiert werden sollten. Die nun folgenden Schritte wurden von Prof. Witt ausgeführt. Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe entwässert und in einer Mischung aus 100%-igem Ethanol und Epon-812-Harz und darauf folgend in reinem Eponharz über Nacht durchtränkt. Anschließend wurden die Schnitte zwischen zwei Lagen ACLAR® Film (Ted Pella, Redding, CA, USA) und von außen zwischen zwei Glasplättchen eingebettet. Das Harz ließ man für 24 h bei 60°C auspolymerisieren. Der ACLAR® Film wurde entfernt, ein Stück des ausgehärteten Harzes mit einem darin enthaltenen Teil des Präparates wurde ausgeschnitten und auf einen Eponzylinder aufgeklebt. Nun wurden Ultradünnschnitte des Präparats angefertigt, die auf Formvar-beschichtete Kupfergrids für die Elektronenmikroskopie aufgenommen wurden. Mittels einer wässrigen 2%-igen Uranylacetatlösung, in der die Präparate für 8 min inkubierten, und einer Bleizitratlösung, die man für 2 min einwirken ließ, erfolgte eine weitere Kontrastierung. Die Begutachtung und Dokumentation der Präparate erfolgte dann mit einem Zeiss EM 906 Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.10. Pharmakainduzierte motorische Verhaltenstests

2.10.1. Apomorphinrotationstest

Die einseitige Zerstörung der dopaminergen Neurone in der rechten SN, die den Verlust der dopaminergen Afferenzen des rechten Striatums bedeutet, hat zur Folge, dass an den dortigen GABAergen und cholinergen Zielzellen der D2-Rezeptorbesatz hochreguliert wird. Verabreicht man einem solch hemiläsionierten Tier systemisch einen D2-Rezeptoragonisten, so wird das Striatum auf der läsionierten Seite aufgrund des höheren Rezeptorbesatzes stärker beeinflusst, als auf der gesunden Seite. Genauer gesagt, kommt es durch eine D2-Rezeptoragonistgabe auf der läsionierten Seite zu einer stärkeren funktionellen Hemmung des Striatums, was aufgrund oben beschriebener Basalganglienverschaltung zu einer erhöhten motorischen Aktivität auf der kontralateralen (der linken) Seite führt, da die Hirnareale für Somatomotorik auf die kontralaterale Seite des Körpers projizieren. Ein solcher Blut-Hirn-Schranke-gängiger D2-Rezeptoragonist ist Apomorphin (in schwächerem Ausmaß aktiviert er auch D1-Rezeptoren). Die Applikation dieses Stoffes in hemiläsionierte Ratten führt dazu, dass diese eine Drehbewegung des gesamten Körpers kontralateral zur Seite der Läsion hin ausführen (Ungerstedt et al., 1969).

Im Zuge eines sogenannten Apomorphinrotationstests wurden einer Ratte 250 µg Apomorphin, welches in einer 0,9%igen Natriumchloridlösung gelöst war, je kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Den Tieren wurde ein Gurt umgelegt, der durch einen Draht mit einem Zählmechanismus verbunden war, durch dessen Hilfe man die Umdrehungen des Versuchstieres in beide Richtungen bestimmen konnte. Die Tiere befanden sich während der Messung in einem runden undurchsichtigen Behältnis mit einem Durchmesser von ca. 25 cm, dessen Seitenwände größer waren als die Ratten in aufgerichteter Position. Die Gesamtheit der Messapparatur bezeichnet man als Rotometer. Diese wurde im Auftrag von Dr. SJP Haas nach den Plänen von Prof. G. Nikkhah angefertigt. Der Apomorphinrotationstest erfolgte über einen Zeitraum von 40 Minuten hinweg, wobei sich die Tiere in hierfür geeigneten Behältnissen befanden. (**Abb. 6**)

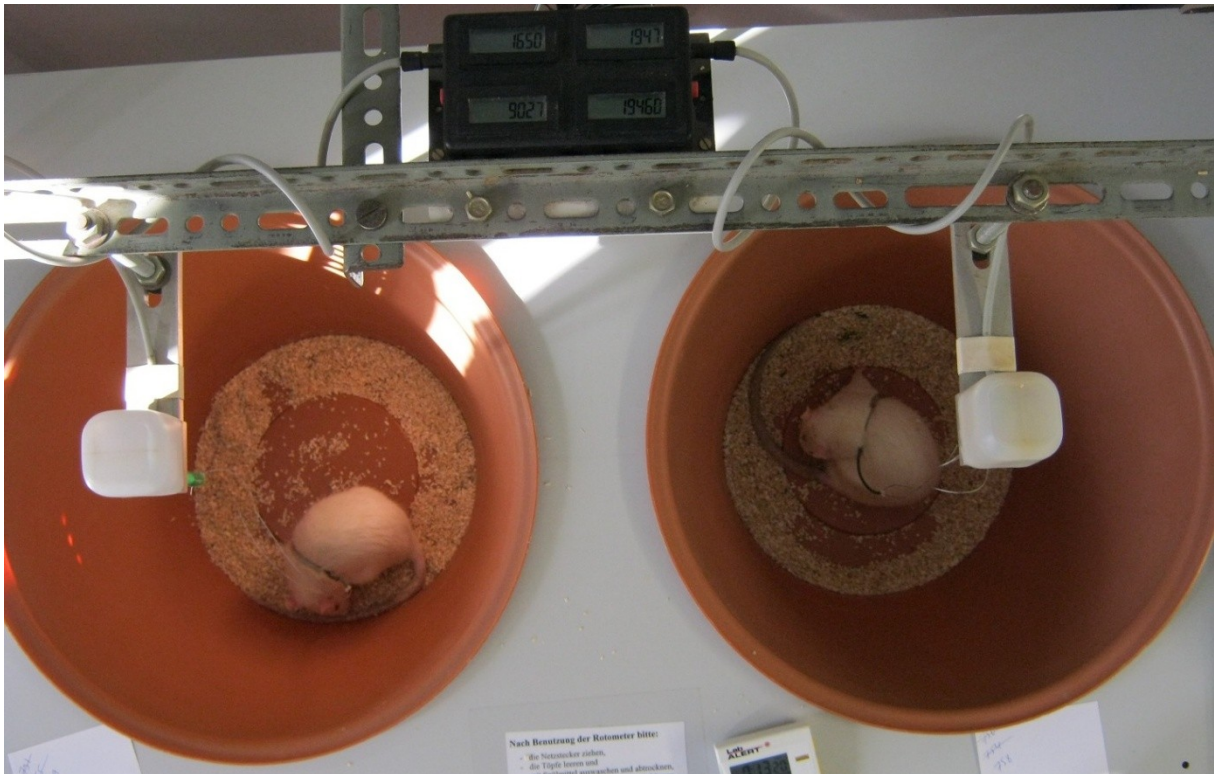


Abbildung 6.: Messapparatur zur Registrierung des pharmakainduzierten Rotationsverhaltens bei Ratten nach Verabreichung von Apomorphin oder Amphetamin

Im dargestellten Bild handelt es sich um rechtsseitig 6-OHDA-läsionierte Tiere, denen kurz zuvor Apomorphin intraperitoneal injiziert wurde. Als Folge führen die Tiere Drehbewegungen entgegen der läsionierten Seite, also entgegen dem Uhrzeigersinn aus. Im oberen Bildrand ist die Zählleinheit zu erkennen, deren obere Displays gemessene 60'stel Umdrehungen im Uhrzeigersinn anzeigen und deren untere Displays registrierte 60'stel Umdrehungen entgegen dem Uhrzeigersinn anzeigen.

2.10.2. Amphetaminrotationstest

Bei dem sogenannten Amphetaminrotationstest macht man sich ebenfalls ein Ungleichgewicht katecholaminerger Innervation des linken und rechten Striatums hemiläsionierter Ratten zu Nutze. Dem Versuchstier werden hierbei 2,5 mg/ kg Körpergewicht Amphetamin gelöst in 0,9%'iger Natriumchloridlösung (2,5 mg Amphetamin/ml) intraperitoneal injiziert. Die Wirkung des Amphetamins besteht in einer vermehrten Ausschüttung von Katecholaminen aus der präsynaptischen Membran hinein in den synaptischen Spalt (Kahlig et al., 2005; Sulzer et al., 2005). Da in einem hemiläsionierten Tier der Großteil der katecholamerger Afferenzen des Striatums aus der SN einseitig nicht mehr vorhanden ist, kann auf der läsionierten Seite aufgrund des Fehlens dopaminerger Axonendigungen kein Dopamin ausgeschüttet werden. Auf der gesunden Hemisphäre ist dies jedoch nach wie vor möglich. Die systemische Applikation von Amphetamin führt also im Gegensatz zu Apomorphin zu einer vermehrten Aktivierung von Dopaminrezeptoren des gesunden Striatums (auf der linken Seite) durch überschießende Dopaminausschüttung, das

Tier fängt darauf hin an im Uhrzeigersinn, also in Richtung der Läsion, zu rotieren. Mit Hilfe dieses Tests werden andere Bestandteile der Basalganglienverschaltung getestet (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970). Die Messung der Rotationen erfolgte analog zu der Messung beim Apomorphinrotationstest, allerdings wurde durch die längere Anflutungsphase und Halbwertszeit des Amphetamins ein Zeitraum von einer Stunde ausgewertet.

2.11. Nichtpharmakainduzierte motorische Verhaltenstests

2.11.1. Zylindertest

Da bei dem Hemiparkinsonmodel die motorischen Fähigkeiten der Versuchstiere auf der kontralateralen Seite beeinträchtigt werden, vor allem was die Initiation von Bewegungen betrifft, hat dies auch einen Einfluss auf die Häufigkeit des Gebrauchs der vorderen Extremitäten bei verschiedenen Tätigkeiten, z. B. dem Tasten, dem Greifen und dem Abstützen beim Aufrichten. Man kann anhand des Verhältnisses vom Gebrauch der linken und der rechten Vorderpfote vor einer einseitigen Läsion der SN, nach einer Läsion und nach einem Therapieversuch Rückschlüsse auf die Effektivität einer potentiellen Therapieoption auf freiwilligen spontanen Gebrauch der vorderen Extremitäten ziehen. Um dieses Verhältnis zu ermitteln, wurde der sogenannte Zylindertest angewandt, bei dem die Ratte in einen Glaszylinder gesetzt wird, der höher ist als sie selbst in aufgerichtetem Zustand. Hier fangen die Ratten an, die für sie neue Umgebung zu erkunden und sich auch rasch aufzurichten (Connor et al., 1999; Schallert und Lindner, 1990; Cohen et al., 2003). Dabei nutzen sie dann ihre Vorderpfoten, um sich nach dem Aufrichten an dem Glaszylinder abzustützen. Bei diesem Test muss und soll die Ratte auch nicht pharmakologisch oder anderweitig durch den Experimentator beeinflusst werden. Aus dem jeweiligen Gebrauch von linker und rechter Vorderpfote bei den aufeinanderfolgenden Abstützvorgängen wird dann ein Verhältnis gebildet. Hier wurden die Ergebnisse für jedes Tier als Quotient dargestellt, künftig l/r-Quotient genannt, wobei die Summe der Berührungen der Glaswand mit der linken Vorderpfote den Dividenden und die Summe der rechten Vorderpfotenberührungen den Divisor darstellten. Insgesamt ließ man jedes Tier 30 Mal die Wand des Zylinders mit den Vorderpfotenflächen berühren. Würde also der l/r Quotient 0 betragen, so hätte das entsprechende Tier ausschließlich mit der rechten Pfote die Wand des Zylinders berührt, würde sich der l/r-Quotient 30 annähern, so hätte das Tier nahezu ausschließlich die linke Pfote verwendet.

Wie erwähnt, wurde eine Ratte für diesen Test in einen Glaszylinder gesetzt, dessen Boden ein wenig mit Einstreu bedeckt ist. Die Ratte wurde während der gesamten Dauer des Tests

durch eine Videokamera (Festplattencamcorder GZ-MG255E, JVC, Japan) aufgenommen, um eine spätere Auswertung möglich zu machen. Um sämtliche Wandberührungen erkennen zu können, auch wenn sich die Ratte von der Kamera abgewandt hat, wurden zwei Spiegel im rechten Winkel zueinander hinter dem Glaszylinder angebracht (**Abb. 7**). Jedes Tier wurde so lange in dem Zylinder belassen, bis sie 30 Mal die Zylinderwand mit den Vorderpfotenflächen berührt haben. Die Anzahl der linksseitigen Vorderpfotenberührungen wurde durch die Anzahl der rechtsseitigen Vorderpfotenberührungen dividiert.

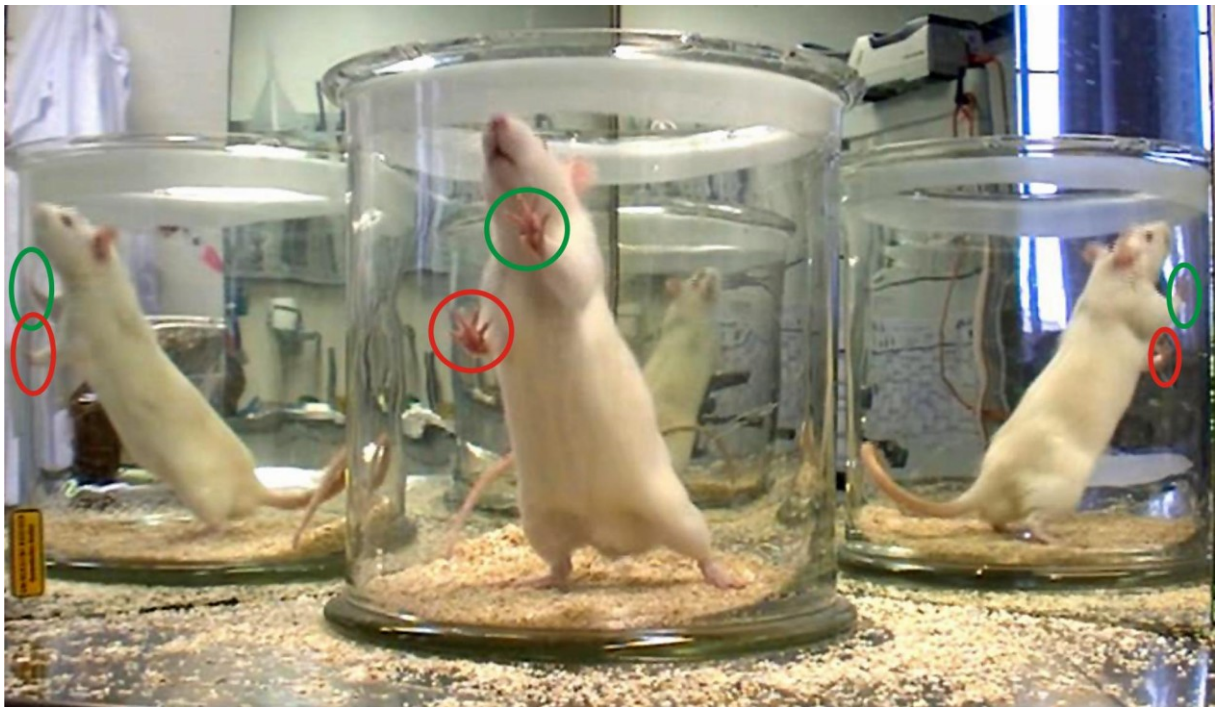


Abbildung 7.: Durchführung und Auswertung des Zylindertestes

Hier wird die Ratte in einen Glaszylinder überführt, der größer ist als sie selbst. Die Ratte wird gefilmt und das erhaltene Videomaterial wird dahingehend ausgewertet, wie oft ein Tier mit der rechten (rote Markierungen) und mit der linken (grüne Markierung) Vorderpfote die Wand des Zylinders berührt hat. Um alle Wandberührungen erkennen zu können, sind Spiegel hinter dem Zylinder aufgestellt. 30 Wandberührungen werden insgesamt ausgewertet und ein Quotient aus linkem und rechten Vorderpfotengebrauch gebildet.

2.11.2. Accelerod -Test (forcierter motorischer Test)

Die Accelerod-Tests wurden von Frau Dr. Antipova, Herrn Dr. Holzmann und Frau Dräger durchgeführt.

In diesem nichtpharmakainduzierten Verhaltenstest wird die motorische Fähigkeit der Ratten getestet sich auf einer beschleunigenden rotierenden Walze durch eigenständige Gehbewegungen zu halten, wobei hauptsächlich motorische Koordination, Gleichgewicht und eventuelle Ataxien überprüft bzw. detektiert werden sollen (Jones und Roberts, 1968).

Der Name des so genannten „Accelerod-Tests“ leitet sich aus dem englischen Wort für beschleunigen - „accelerate“ und dem englischen Wort für „Stange“ oder „Rohr“ - „Rod“ ab. Das Versuchsgerät wurde in diesem Fall von der Firma TSE-Systems (Bad Homburg, Deutschland) bezogen. Dieses stellt eine Versuchseinheit dar, die über eine Walze mit einem Durchmesser von 60 mm verfügt, die in einer Höhe von ca. 25 - 30 cm angebracht ist und die sich über einen Elektromotor in unterschiedlichen Geschwindigkeiten drehen kann. Vier Bereiche auf dieser Walze sind durch undurchsichtige Kunststoffwände eingeteilt, in denen man vier Versuchstiere getrennt voneinander testen kann. (**Abb. 8**) Die Ratten werden auf die sich rotierende Walze gesetzt und sollen auf dieser selbstständig gehen, um sich so lange wie möglich auf dieser zu halten. Am Boden verfügt das Gerät über vier Lichtschranken, so dass das Gerät das Hinunterfallen eines Versuchstieres sofort registrieren kann. Des Weiteren setzt sich die Versuchsapparatur aus einer Steuerungseinheit und einem Computer samt Bildschirm, Tastatur und entsprechender Steuerungssoftware zusammen.

Die Testung der motorischen Fähigkeiten der Tiere auf dem Accelerod setzte sich aus einer jeweils dreitägigen Trainings- bzw. Lernphase und einer eintägigen Messphase zusammen. Im Zuge der Trainingsphase sollten die Tiere erlernen selbstständig auf der sich drehenden Walze zu laufen. Gleichzeitig wurde diese Phase genutzt, um das motorische Lernverhalten der Tiere zu ermitteln. In der Lernphase wurde das Tier vier Mal täglich auf die sich schon mit vier Umdrehungen in der Minute drehende Walze gesetzt. Sobald das Tier auf der Walze war, wurde die Drehgeschwindigkeit auf 12 Umdrehungen in der Minute erhöht. Bei dieser Geschwindigkeit sollte das Tier es möglichst schaffen 120 Sekunden auf der Walze zu gehen. Fiel es vorher herunter, wurde es zügig wieder auf die Walze gesetzt bis die 120 Sekunden vorüber waren. Die Anzahl der Stürze innerhalb der 120 Sekunden wurde notiert und floss in die Auswertung des motorischen Lernverhaltens ein. Am Ende der Trainingsphase wurden solche Tiere ausgesondert, die in den drei Tagen keine Lernerfolge zeigten – die so genannten „Verweigerer“.

Am Tag der eigentlichen Messung erfolgten je Ratte zwei Messungen. Das jeweils Beste Ergebnis wurde als relevant erachtet und floss in die Auswertung ein. Hier wurde die Versuchsratte auf die schon mit 4 U/min rotierende Walze gesetzt, worauf der Messmodus gestartet wurde, bei dem die Walze innerhalb von 300 Sekunden konstant auf eine Geschwindigkeit von 40 U/min beschleunigte. Stürzte das Tier, wurden automatisch die verbrachte Zeit auf der Walze, die zurückgelegte Strecke und die Geschwindigkeit der Walze zum Zeitpunkt des Sturzes registriert.



Abbildung 8.: Accelerod-Apparatur der Firma TSE-Systems (Bad Homburg, Deutschland)

Bis zu vier Ratten gleichzeitig können auf der rotierenden Walze der Accelerod-Apparatur getestet bzw. trainiert werden. Die Zeitnahme wird mittels Druck auf die jeweiligen grünen Knöpfe an der unteren Front des Gerätes gestartet. Am Boden der Apparatur befinden sich vier Lichtschranken, die einen Sturz eines Tieres registrieren. Dies wird sofort an die Auswerte- und Steuerungssoftware, die auf einem angeschlossenen Windows-PC-System installiert ist, weitergeleitet.

2.11.3. Open-Field-Test

Der Open-Field-Test wurde von Frau Dräger und Herrn Dr. Holzmann durchgeführt.

Um die spontane motorische Aktivität der Versuchstiere zu messen, wurden die Tiere einem so genannten „Open- Field-Test“ unterzogen. Die Testung erfolgte in einer Open-Field Anordnung von TSE (TSE, Bad Homburg, Germany). Das Prinzip des Open-Field-Testes bestand darin, dass man die Tiere in eine durch Wände, die größer als das Tier selbst sind, abgegrenzte quadratische Testarena (50 cm x 50 cm) gab, die für das Tier vollkommen neu und größer als der Heimkäfig des Tieres waren. Für das Tier gab es aufgrund der vollkommen freien Fläche keine weiteren Versteckmöglichkeiten, außer die unmittelbare Nähe der Wände und deren Ecken. Gleichzeitig war die gesamte Apparatur (Testarena, Kamera, Beleuchtung) in einer reizfreien/ reizarmen Umgebung positioniert, in diesem Fall eine hierfür angefertigte Box, die dem Tier keine Möglichkeit gab, hinaus zu schauen und die lichtundurchlässig war (Isolationsbox, **Abb. 9 A, B**). So konnte im Open Field eine genau definierte Beleuchtung realisiert werden. An der Decke der Box war eine leistungsstarke Kamera angebracht, mit der die Arena samt Tier auch bei geringer Beleuchtung gefilmt werden konnte. (**Abb. 9 C**) Es wurde während der Experimente auf Geräuschfreiheit/ Geräuscharmut geachtet. Vor jeder Testung wurde die Arena gereinigt. Aufgrund der Reizarmut dieses Versuchskonzepts ist das Open-Field eine attraktive Variante zur einfachen Untersuchung der motorischen Spontanaktivität und Leistung.

Des Weiteren gehörten zu dieser Versuchseinheit ein DVD-Recorder und ein PC-System mit der Steuerungs- und Auswertesoftware „VideoMot 2“. Durch diese Software konnte die Testfläche virtuell in verschiedene Quadranten eingeteilt werden. Versuchsratten wurden

Material und Methoden

durch "VideoMot 2" automatisch erkannt und ihre Bewegungen verfolgt, sowie bestimmt, wie lange sich eine Ratte in welchem Quadranten der Testarena aufhielt, also ob sie sich vermehrt in den Ecken und an den Wänden aufhielt oder sie sich vermehrt in der Mitte der Testfläche bewegte. (Abb. 9 C, D)

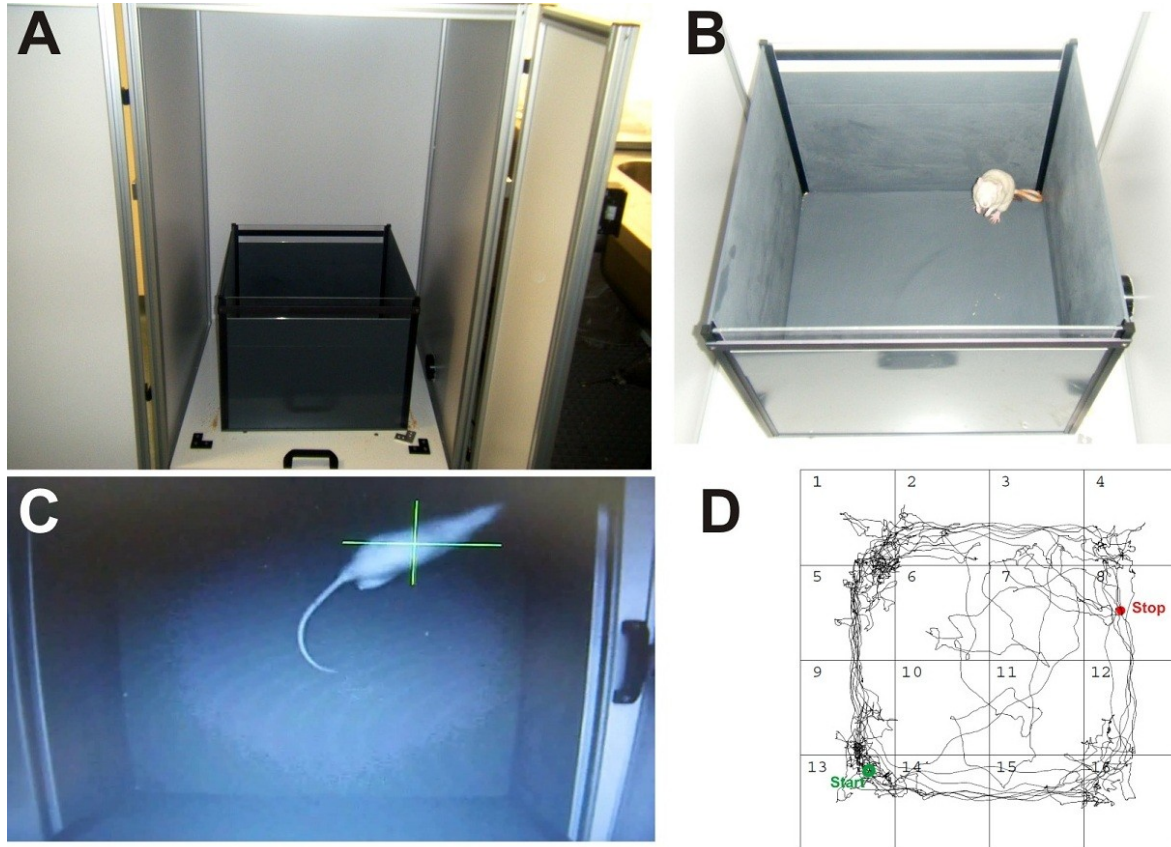


Abbildung 9.: Open-Field-Apparatur

Zu erkennen ist in (A) die lichtdicht verschließbare schrankähnliche Box, die sich durch eine an der Decke angebrachte Illuminationseinrichtung definiert beleuchten lässt, in der die eigentliche Testarena platziert ist. In (B) ist die quadratische Testarena (50 cm * 50 cm) dargestellt, die bereits mit einem Tier besetzt wurde. Ihre Begrenzung besteht aus Wänden, die größer als die Versuchstiere im aufgerichteten Zustand sind. (C) Hier ist ein Ausschnitt der Echtzeit Videoanalyse durch das Programm "VideoMot 2" abgebildet. Das Programm erkennt das Tier automatisch und markiert es durch ein grünes Kreuz. Die Testarena wird zuvor virtuell in 16 Quadranten unterteilt (C) und das Programm "VideoMot 2" misst in Echtzeit, mit welcher Geschwindigkeit sich die Ratte bewegt und wie viel Zeit sie in den einzelnen Quadranten verbringt (D).

Weiterhin wurden durch die Software auch Defäkationen erkannt und gezählt. Neben der Analyse der zurückgelegten Strecke im Open Field in einen definierten Zeitraum von zehn Minuten und der Präferenz der Aufenthaltsorte der Ratten wurde ebenfalls eine Untersuchung der Häufigkeit des Putzverhaltens ("Grooming") durchgeführt. Hierzu wurde die Ratte während der Versuchsphase im Open Field auf einem Bildschirm beobachtet und bei jedem Putzvorgang, den die Ratte durchführte, signalisierte dies der Experimentator der Auswertungssoftware durch einen spezifischen Tastendruck. Auch das Erkundungsverhalten der Tiere, dass sich durch Aufrichten äußerte, wurde analysiert. Richtete sich ein Tier im

Open Field auf, so wurde dies der Open-Field-Software ebenfalls durch einen spezifischen Tastendruck übermittelt.

Das spontane motorische Verhalten der verschiedenen Versuchstiergruppen (unbehandelte Ratten, scheinläsionierte und schein-BoNT-A-behandelte Ratten, BoNT-A-behandelte Ratten, läsionierte schein-BoNT-A-behandelte Ratten und läsionierte BoNT-A-behandelte Ratten) wurde so zu verschiedenen Zeitpunkten nach den Operationen gemessen.

Im Open Field fanden zwei große Versuchsreihen statt:

In der ersten Versuchsreihe wurden Tiere, die einseitig mit 6-OHDA striatal dopaminerg deafferentiert wurden und danach ipsilateral mit 1 ng oder 2 ng BoNT-A behandelt wurden getestet. Zusätzlich zu diesen Gruppen wurden Tiere getestet, denen anstatt BoNT-A lediglich die Vehikelsubstanz in das Striatum injiziert wurde, sowie Tiere denen in das rechte MVB die Vehikellösung für 6-OHDA injiziert wurde und die vier Wochen danach ebenfalls nur die Vehikellösung des BoNT-A intrastriatal appliziert bekamen. Bei diesem ersten Versuchsblock wurde eine möglichst schwache Beleuchtung gewählt, die erfahrungsgemäß von den Tieren nicht als bedrohlich und unangenehm empfunden wird. Hier sollten vornehmlich die motorischen Fähigkeiten und das Vermögen der Tiere sich frei zu bewegen getestet werden. An jedem Zeitpunkt einer Messung erfolgte für jedes Tier eine zweimalige Testung im Open Field innerhalb von 24 h. Aus den gewonnenen Werten für die Laufstrecken wurde anschließend der Mittelwert gebildet. Dies geschah, um die Tiere an das Open Field zu habituierten und den anxiogenen Faktor der Versuchsanordnung zu minimieren, so dass vornehmlich das spontane motorische Verhalten gemessen werden konnte.

In der zweiten Versuchsreihe wurden Tiere im Open-Field getestet, denen beidseitig in das Striatum je 1 ng BoNT-A appliziert wurde. Eine 6-OHDA-Läsion bei den Tieren fand nicht statt. Auch hier gab es zusätzlich zwei Kontrolltiergruppen. Der ersten Kontrolltiergruppe wurde die Vehikelsubstanz des BoNT-A injiziert und die zweite Kontrolltiergruppe blieb gänzlich unbehandelt. In dem zweiten Versuchsblock lag die Gewichtung des Tests auf der Ermittlung der Ängstlichkeit der Tiere. Aus diesem Grund wurde eine starke Beleuchtung von 400 Lux gewählt. Fünf Wochen nach Behandlung fand die Testung der Ratten im Open Field statt. Dieses Mal wurde jede Ratte nur ein einziges Mal in die Open-Field-Anordnung verbracht und getestet, um eine Habituation auszuschließen und eine Messung der Ängstlichkeit zu gewährleisten. Die Neuartigkeit des Umfeldes und die helle Beleuchtung sollten den Tieren nämlich als anxiogene Eigenschaften dienen.

2.11.4. Water Maze

Für die Durchführung des Water-Maze-Testes bedanke ich mich bei Frau Dräger und Herrn Dr. Holzmann.

In dieser Versuchsanordnung soll hauptsächlich das räumliche Lernvermögen der Tiere getestet und eruiert werden, ob die Tiere durch die intrastriatale BoNT-A-Applikation kognitive Defizite davontragen.

Die Versuchsanordnung bestand aus einer runden Wanne mit einem Durchmesser von ca. 105 cm und einer Wandhöhe von ca. 60 cm, einer Kamera (Eneo VK-1316 S), die die Wanne senkrecht von oben komplett erfassen konnte und einem angeschlossenen Rechner samt Auswertesoftware „VideoMot 2“. In der Wanne selbst befand sich eine fest installierte Plattform, die ca. 28 cm aufragt. Für die Experimente wurde die Wanne mit Wasser, das milchig trüb eingefärbt wurde, auf ca. 30 cm Höhe aufgefüllt, so dass das Versuchstier nicht die Plattform, die nun nur leicht mit Wasser bedeckt war, sehen konnte. Das Wasser hatte während des Experiments eine Temperatur von 25°C. In dem Raum in dem sich das Water Maze befand, herrschte während des Umgangs mit den Versuchstieren eine schwache indirekte Beleuchtung von ca. 3,8 Lux, um den Stress für die Tiere möglichst gering zu halten. Die Tiere wurden vorsichtig mit den Hinterläufen voran in das Wasser gegeben, so dass Stress vermieden wurde. An der Kante des Beckens befanden sich in Sichtweite einer zu testenden Ratte und im Abstand von jeweils 90° des kreisrunden Beckens zueinander vier unterschiedliche Symbole, anhand derer sich die Ratte im Becken orientieren konnte.

Jedem Tier wurde die Möglichkeit gegeben, sich an das Water Maze zu gewöhnen. Hierzu ließ man jedes Tier für 90 s in der Wanne schwimmen und führte es, falls es innerhalb dieser Zeit nicht selbst geschafft hat die Plattform zu finden, zu der Plattform. Hierdurch wurde dem Tier signalisiert, dass in dem Becken des Water Maze eine solche Plattform vorhanden ist, auf die sich das Tier zurückziehen kann, denn Schwimmen stellt im Allgemeinen einen Stress für die Ratte dar. Im Anschluss wurde jede Ratte einem dreitägigen Training unterzogen. An den ersten beiden Tagen ließ man jede Ratte acht Mal am Tag je 60 s in dem Water Maze schwimmen. Am letzten Tag ließ man die Ratten weitere vier Mal im Water Maze schwimmen. Es wurde die Latenz für das Auffinden der Plattform ermittelt.

Die Analyse und Auswertung der Performance der einzelnen Ratten im Water Maze geschah durch die Software „VideoMot 2“. Hierzu wurde die Fläche des Water-Maze-Beckens virtuell in mehrere Quadranten eingeteilt. Schon während der Trainingsphase wurde ausgewertet, wie schnell die Tiere der einzelnen Tiergruppen in der Lage waren, im Verlauf der Testphasen die Plattform zu finden.

Nach der Trainingsphase wurden die Ratten im Water Maze getestet, nun wurde jedoch die versteckte Plattform, deren Position die Ratten erlernt haben sollten, entfernt. Es wurde nun gezählt, wie oft der Quadrant mit der ehemaligen Position der Plattform gekreuzt wurde. Eine erhöhte Zahl der Kreuzungen wies auf besseres räumliches Lernen hin.

2.11.5. Radial Maze

Der Radial-Maze-Test wurde freundlicher Weise von Herrn Dr. Holzmann durchgeführt.

Der Versuchsaufbau bestand aus acht im 45° -Winkel zueinander angeordneten Gängen, auch Arme genannt, die seitlich durch Wände begrenzt, oben aber offen und an einem Ende verschlossen waren. Die Länge der Gänge betrug 550 mm, die Breite 150 mm und die Höhe der Außenwände 225 mm. (**Abb. 10**) Am Ende der Arme wurde, je nach Versuchsprofil, für die Ratten schmackhaftes Futter (nach Früchten schmeckende Cornflakes) platziert. Eine Kamera (Eneo VK-1316 S) filmte senkrecht von oben die Apparatur.

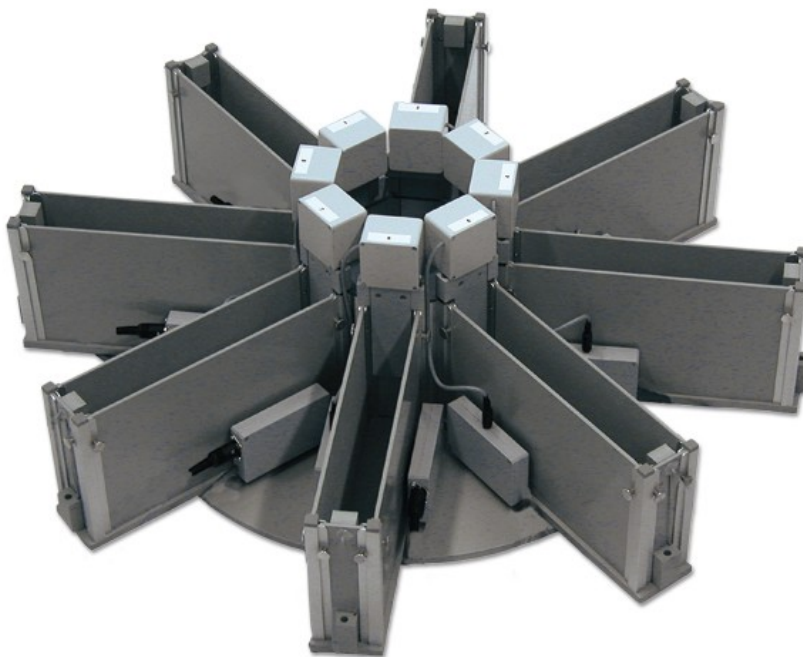


Abbildung 10.: Aufbau einer Radial-Maze-Apparatur

Die hier abgebildeten Wände zum Zentrum der Versuchseinheit hin, wurden für die vorliegenden Versuche nicht benötigt.

Abbildung entnommen von www.tse-systems.com

Auch hier sollten die kognitiven Fähigkeiten der Ratten untersucht werden, im Speziellen wurde mit diesem Test das Arbeitsgedächtnis der Tiere geprüft. Es wurde die Fähigkeit der Tiere getestet sich auf Dauer zu merken, welche der acht Arme mit Futter befüllt sind und welche nicht, sowie sich zu merken, welche der Arme sie bei dem jeweiligen Testdurchlauf bereits besucht und das Futter dort entnommen haben und welche Arme noch zu besuchen waren.

Die offenen Enden der Gänge mündeten im Zentrum des durch sie gebildeten Sterns, in dieses wurden die jeweiligen Tiere beim Start eines Experimentes gesetzt.

Während der Testung mit dem Radial Maze herrschte in dem entsprechenden Raum eine schwache indirekte Beleuchtung von 25 – 85 Lux. Die Analyse des Verhaltens der Tiere im Radial Maze geschah wieder computergestützt. Die Signale der Kamera, die die Radial-Maze-Apparatur filmte, wurden von einer entsprechenden Software („VideoMot 2“) ausgewertet, dabei wurde jedem Arm ein bestimmter virtueller Quadrant zugewiesen. Das entsprechende Tier wurde automatisch erkannt.

Das Versuchsprotokoll dieser Arbeit stellt eine Modifikation der Arbeit von Holscher und Schmidt (1994) dar und wurde in ähnlichen Formen auch in anderen Studien eingesetzt (Nguyen et al., 2006; von Hörsten, 2003).

Für die korrekte Durchführung dieses Kognitionstestes und um sich die Motivation der Versuchstiere zu sichern, war es notwendig, die Tiere schon drei Tage vorher einer Futterdeprivation auszusetzen. Zunächst wurde den Tieren einmalig die Möglichkeit gegeben die Radial-Maze-Apparatur zu erkunden und sich an diese zu gewöhnen. Hierzu setzte man jedes Tier für 10 min in die Apparatur, wobei aber noch keiner der Arme mit Futter beschickt war. An einem darauffolgenden Tag wurden alle Arme am Ende mit für die Tiere schmackhaften Futterpellets befüllt. Eine Ratte wurde in die Versuchsapparatur verbracht und damit das Experiment gestartet. Der Versuch endete sobald das Tier sämtliche Flakes aus allen Armen verspeist hatte bzw. nach spätestens 5 Minuten. Hier wurde vornehmlich gezählt, wie oft das Tier wieder (fälschlicher Weise) in einen bereits besuchten Arm zurückgekehrt ist, aus dem es bereits das Futter gefressen hat. Dies sollte der Detektion möglicher Defizite im Arbeitsgedächtnis der Tiere dienen.

In den darauf folgenden fünf Tagen wurden nur noch vier der acht Arme mit Futter befüllt. Welche der Arme mit Futter beschickt waren und welche nicht, war hierbei fünf Tage lang konstant. In diesem dritten Experiment wurde zum Einen gezählt wie oft das Tier „fälschlicher Weise“ einen bereits besuchten Arm nochmalig aufgesucht hat um weiterhin das Arbeitsgedächtnis zu untersuchen, zum Anderen wurde gezählt, wie oft ein Tier fälschlicher Weise Arme besucht hat, in denen innerhalb dieser fünf Tage noch nie Futter platziert worden ist. Dies geschah um das Referenzgedächtnis zu testen. Nach diesen fünf Versuchstagen wurden die jeweils anderen Arme mit Futter beschickt und Arme, die vorher Futter enthielten, blieben nun leer. Auch hier endete der Versuch nach 5 Minuten, oder wenn das Tier sämtliche Futterpellets gefressen hat. Diese Anordnung wurde über fünf Tage beibehalten. So sollte ermittelt werden, wie schnell die Ratten in der Lage waren sich auf die neuen Gegebenheiten einzustellen.

2.11.6. Elevated Plus Maze

Der Elevated-Plus-Maze-Test wurde durch Dr. Holzmann durchgeführt.

Durch die Testung im Elevated Plus Maze sollte eruiert werden, inwieweit eine bilaterale BoNT-A-Injektion in das Striatum bei Ratten zu einer Alteration des Angstverhaltens führt.

Die Elevated-Plus-Maze-Apparatur besteht aus vier Gängen (425 mm x 145 mm), die in einem 90°-Winkel zueinander angeordnet sind und sich in einem zentralen Bereich vereinigen. Zwei gegenüberliegende Gänge verfügen über hohe Seitenwände (225 mm) und werden als "geschlossene Arme" bezeichnet, die anderen beiden Gänge besitzen keine Seitenwände und werden als "offene Arme" bezeichnet. Die Apparatur ist in ungefähr 1 m Höhe angebracht, so dass eine Ratte, befindet sie sich auf einem offenen Arm, keinen benachbarten Untergrund erkennen kann. (**Abb. 11**) Die "offenen Arme" werden von Ratten normalerweise als bedrohlich empfunden und gemieden. Ein vermehrter Besuch dieser Arme würde auf eine verminderte Ängstlichkeit dieser Tiere hinweisen (Cruz et al., 1994; Fernandes und File, 1996; File, 1987; Montgomery und Monkman, 1955; Pellow et al., 1985).



Abbildung 11.: Versuchsaufbau des Elevated Plus Maze

Für die Testung wurden die Tiere für fünf Minuten in die Versuchsanordnung gesetzt und ihre Aktivität mit dem selben Videotrackingssystem erfasst und ausgewertet wie es für das Radial Maze beschrieben ist. Die Tiere wurden dabei mit dem Kopf in Richtung eines offenen Arms auf die Plattform im Zentrum der Anordnung gesetzt. In dem Raum mit der Versuchsapparatur herrschte eine gedämpfte Beleuchtung von 3,5 Lux. Erfasst wurden neben den Totalbesuchen der einzelnen Arme und dem Verhältnis der Besuche von offenen zu geschlossenen Armen auch die zurückgelegte Gesamtstrecke sowie die Defäkation.

2.12. Stereologie

Die Zellzählungen wurden von Frau Dr. Antipova durchgeführt, die theoretische und praktische Betreuung der Stereologie erfolgte durch Prof. Oliver Schmitt.

2.12.1. Zählung sämtlicher Neurone im Striatum

Für die Zählung sämtlicher Neurone in den Striata von BoNT-A behandelten Tieren wurden Parallelschnitte der Gehirne herangezogen, die mittels Cresylviolett Nissl-gefärbt wurden. Hierbei handelte es sich um jeden siebten Schnitt eines komplett geschnittenen Gehirns.

Ausgezählt wurde mittels einer speziellen Zähleinheit, die aus einem Mikroskops (BX 51, Olympus, Tokyo, Japan) bestand, das mit einem digital ansteuerbaren Objektträgtisch (MT12; Heidenhain, Traunreut, Germany), einer digitalen Kamera (CX9000, MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA) und einem auf einer 64-Bit Windows-XP®-Version basierenden PC-System, das über das Steuer- und Auswerteprogramm StereoInvestigator (v8.0, MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA) verfügte, kombiniert war. Für die Zählung der Neurone wurde ein UPlanApo 40x-Objektiv verwandt. Neurone wurden in der Zählung daran erkannt, dass ihr Zellkern über einen deutlich erkennbaren Nucleolus verfügte und dass die Zellkerne von einem deutlichen und großen Zytoplasmasaum umgeben waren. Dies war bei Gliazellen nicht der Fall. Das CPU wurde virtuell als Region des Interesses markiert, woraufhin durch das Programm ein vorher definiertes Zählraster über die Region gelegt wurde, bei dem sich alle $300\ \mu\text{m} * 300\ \mu\text{m}$ ein Zählrahmen befand, der $60\ \mu\text{m} * 60\ \mu\text{m}$ maß. Es wurden nur Neurone gezählt, die sich in einem Zählkästchen befanden und die nicht mit ihrem Soma die linke und/ oder untere Kante des Zählkästchens berührten. Wurde die rechte und/ oder obere Kante eines Zählkästchens durch ein Neuron berührt, so wurde es mitgezählt. (**Abb. 12**)

Gezählt wurde an zwei Gehirnen von Tieren, die sechs Monate, und an fünf Gehirnen von Tieren, die zwölf Monate nach einer intrastriatalen Injektion von 1 ng BoNT-A überlebt haben. Es wurde jeweils im Striatum gezählt, in das BoNT-A injiziert wurde, als auch im kontralateralen, unbehandelten Striatum.

2.12.2. Zählung cholinergischer Interneurone im Striatum

Von den Gehirnen der BoNT-A-behandelten Ratten wurde jeder siebte Parallelschnitt immunhistochemisch gegen ChAT angefärbt. Diese Präparate wurden genutzt, um die cholinergen Nervenzellen in den BoNT-A behandelten Striata als auch in den kontralateralen unbehandelten Striata auszuzählen. Die Auszählung geschah analog zu der Auszählung der

Gesamtzahl der Neurone. Cholinerge Nervenzellen konnte man nun durch ihre spezifische Anfärbung eindeutig erkennen. Lediglich die Architektur des Zählrasters wurde für diese Zwecke modifiziert. (**Abb. 12**)

An den Gehirnen von drei Tieren die sechs Monate nach einer unilateralen Behandlung mit 1 ng BoNT-A überlebt haben, erfolgte eine Auszählung der striatalen cholinergen Interneurone.

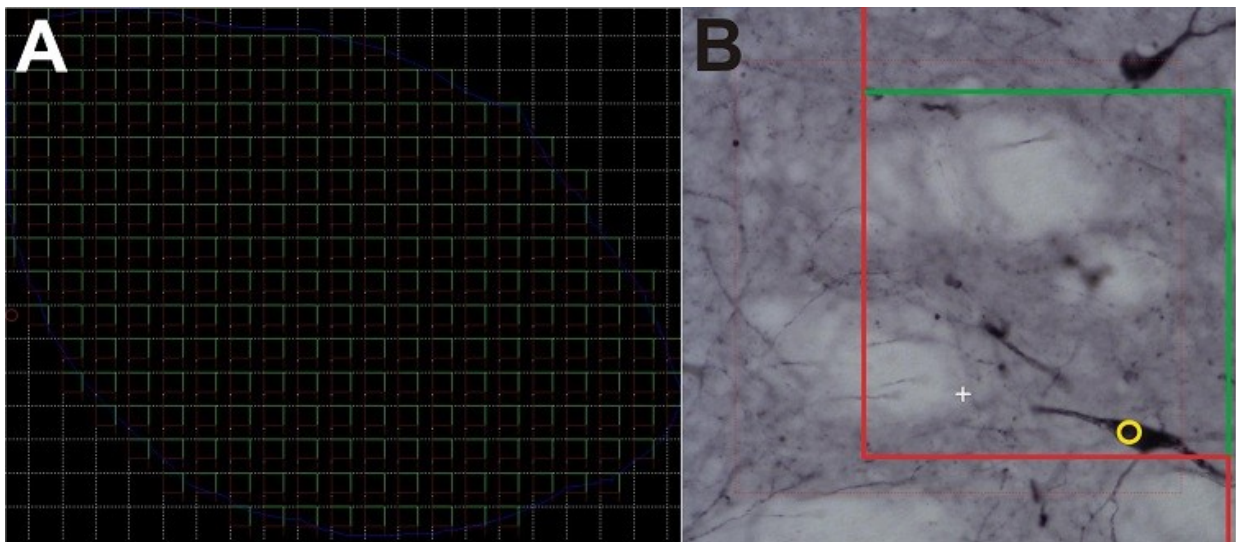


Abbildung 12.: Semiautomatisierte Auszählung cholinergischer Interneurone in den Striata der Versuchsratten

(A) Die Zähl- und Auswertesoftware legt virtuell in ein umrandetes (blau) und somit als "Region of Interest" markiertes CPU eines gegen ChAT angefärbten Gehirnschnittes ein Zählraster vorher definierter Rastergröße. Jedes Zählkästchen des Rasters setzt sich aus einer linken roten, einer unteren roten, einer rechten grünen und einer oberen grünen Begrenzung zusammen (B). Gezählt wurden cholinerge Zellen, deren Soma im Zählkästchen liegt oder die die grüne Begrenzung schneidet. Zellen, die mit einem Teil ihres Somas die rote Begrenzung eines Zählkästchens berührten, wurden von der Zählung ausgeschlossen. Gezählt wurde in einer höheren Vergrößerung in dem die entsprechende Zelle angeklickt wurde und somit durch ein spezifisches Symbol, in diesem Fall ein gelber Kreis, markiert wurde (B).

2.12.3. Volumenbestimmung des Striatums

Bei der Zählung der Gesamtzahl der Neurone sowie der cholinergen Nervenzellen musste das Striatum virtuell umfahren bzw. markiert werden. Hieraus konnte durch das Programm StereoInvestigator die Fläche des Striatums im jeweiligen Anschnitt ermittelt und im Weiteren durch die Multiplikation mit Schnittdicke und Schnittzahl das Gesamtvolumen des Striatums bestimmt werden.

2.12.4. Digitale Analyse der Dichte von BoNT-A induzierten Varikositäten im Striatum

Im Zuge der mikroskopischen Analyse der immunhistochemisch gegen TH und ChAT angefärbten Gehirnschnitte, wurden in den BoNT-A-behandelten Striata sowohl TH- als auch ChAT-positive Varikositäten aufgefunden. Um die Verteilung dieser Strukturen im Striatum untersuchen zu können, wurden exemplarisch anti-TH-gefärbte Gehirnschnitte von zwei Ratten mittels eines Mirax Virtual Slide Scanners (Zeiss, Jena, Deutschland) digitalisiert. Die so gewonnenen Bilder wurden für jedes Tier zu einem hochauflösenden Bildstapel konvertiert. Hieran wurde interaktiv das Striatum als Region des Interesses markiert und durch einen speziell entwickelten Rechenalgorithmus im Programm Matlab (Mathworks) auf einem 64-Bit Linux-basiertem PC-System wurden automatisiert anhand der Graustufen in den Bildern und anhand der Form der Varikositäten eben diese erkannt und gezählt, sowie deren Dichteverteilung in den einzelnen Bereichen des Striatums ermittelt. (**Abb. 21 und 22**) Die Verteilungsdichte der Botulinumtoxin-A-induzierten Varikositäten (BiVs) wurde hier durch Farben kodiert.

2.13. Statistik

Die statistische Analyse des zeitlichen Verlaufs der apomorphininduzierten Rotationen einer Gruppe erfolgte durch einen gepaarten T-Test. Zum Vergleich des Rotationsverhaltens von BoNT-A-behandelten Tieren und Vehikel-behandelten Tieren wurde ein zweiseitiger Student's T-Test für ungepaarte Beobachtungen angewandt. Auch bei der quantitativen Analyse der immunhistochemischen Färbungen wurde ein zweiseitiger Student's T-Test für ungepaarte Beobachtungen verwendet.

Trainingsdurchläufen des Accelerodtestes, des Radial-Maze-Testes und des Water-Maze-Testes der beidseitig BoNT-A-behandelten Tiere wurde durch eine Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Die Messwerte wurden zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung getestet. Bei normalverteilten Messwerten wurde ein Post-Hoc Test nach Holm-Sidak durchgeführt, wenn die Varianzanalyse signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) feststellte. Bei nicht normalverteilten Messwerten wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis Test benutzt, der statt der Original-Messwerte die Rangwerte der Daten vergleicht. Bei signifikanten Unterschieden wurden multiple Vergleichstests durchgeführt (Dunn Test).

Der Holm-Sidak- oder Student-Newman-Keul's-Test wurden für post hoc Vergleiche angewandt. Als signifikant wurden stets Ergebnisse mit einem Wert $p \leq 0,05$ angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. BoNT-A Dosisfindung bei Ratten

Für die Ermittlung der optimalen therapeutischen Dosis von BoNT-A bei Injektion in das Striatum von Ratten wurden Vorexperimente durchgeführt; Wistar-Ratten erhielten in die oben genannten Zielpunkte BoNT-A in einem Dosisbereich von 100 pg bis 5 ng. Dieser Bereich orientierte sich an der Arbeit von Antonucci et al. (2008), in der die intrazerebrale Applikation von BoNT-A bei Ratten und Mäusen beschrieben wurde. Mengen von 100 pg und 1 ng BoNT-A wurden von den Ratten gut bis sehr gut vertragen, 2 ng jedoch führten bei einigen Tieren ca. 5 Tage postoperativ zu einer Verschlechterung des Zustandes mit Gewichtsabnahme, struppigem Fell, verklebten Augen und der Entwicklung eines Brillenhämatoms sowie Apathie und torkelndem Gang. Bei der Hälfte der hiervon betroffenen Tiere besserte sich im Verlauf der darauffolgenden ein bis zwei Wochen der Zustand deutlich, die andere Hälfte musste aufgrund der Schwere der Komplikationen eingeschläfert werden. Von zwei Tieren, denen 5 ng BoNT-A injiziert wurden, verstarb eins rasch an einem Atemstillstand.

Für die weiteren Experimente wurden deshalb bei einseitiger BoNT-A-Injektion Dosen von 100 pg, 1 ng und 2 ng gewählt, bei Versuchen mit beidseitiger Injektion 1 ng in jedes Striatum.

Nach einer BoNT-A-Injektion zeigten die entsprechenden Ratten in Ihren Heimkäfigen keine erkennbaren Unterschiede in Ihrem spontanen Verhalten zu scheinbehandelten Tieren.

3.2. Pharmakainduzierte motorische Verhaltenstests

Bei der nachfolgenden Darstellung der Ergebnisse der Rotationstests werden Umdrehungen der Tiere im Uhrzeigersinn, also zur rechten Seite hin, immer mit einem negativen Vorzeichen (-) versehen, die Umdrehungen entgegen dem Uhrzeigersinn werden als positive Werte dargestellt. Angegeben werden hierbei stets Umdrehungen/ Rotationen in der Minute (U/min).

3.2.1. Apomorphinrotationstest

3.2.1.1. Nur-BoNT-A-behandelte Ratten

Wurde gesunden jungen adulten (ca. drei Monate alten) Wistar-Ratten 1 ng BoNT-A in das rechte CPU injiziert, so konnten bei einer Applikation von 25 µg Apomorphin je kg KG eine leichte apomorphininduzierte Rotationsneigung zu der injizierten Seite hin beobachtet

Ergebnisse

werden. Dieser Effekt war jedoch nach zwei Monaten schon wieder verschwunden und während der nachfolgenden Messungen neigten die Ratten dazu, unter Apomorphin entgegen dem Uhrzeigersinn zu rotieren, jedoch waren die durchschnittlichen Ergebnisse nie signifikant (**Diagramm 1; Tabelle 6A**).

Die unilaterale intrastriatale Applikation von 100 pg BoNT-A zog im Apomorphinrotationstest ebenso wie Scheinbehandlung kein signifikantes Rotationsverhalten nach sich.

Tiere, denen 2 ng BoNT-A in das rechte Striatum injiziert wurden, zeigten im Apomorphintest einen Trend zu Rotationen im Uhrzeigersinn, die etwas stärker ausgeprägt waren (nach einem Monat $-1,78 \pm 2,47$ U/min) als die von Tieren, die mit 1 ng BoNT-A behandelt wurden. Auch hier war nach zwei Monaten kein signifikantes Rotationsverhalten mehr zu beobachten (**Tabelle 6A**).

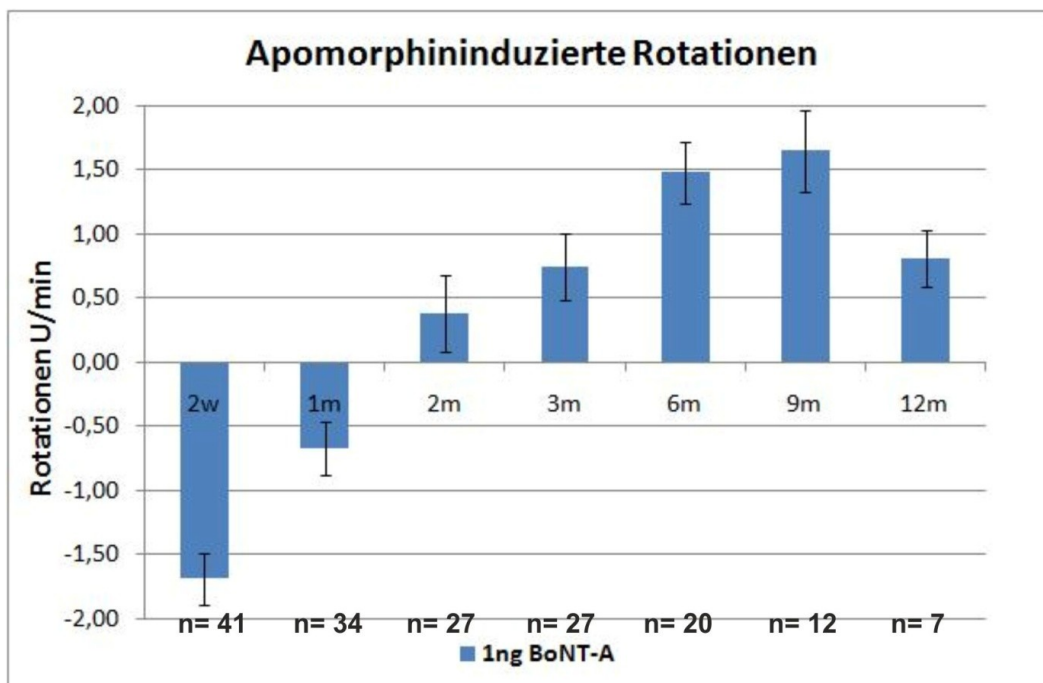


Diagramm 1: Entwicklung des apomorphininduzierten Rotationsverhaltens über die Zeit von Wistar Ratten, denen 1 ng BoNT-A in das rechte Striatum injiziert wurde

Angegeben ist jeweils die durchschnittliche Zahl der Rotationen in der Minute. Kurzzeitig nach der BoNT-A-Injektion besteht ein Trend zu einem leichten apomorphininduziertem Rotationsverhalten zur Injektionsseite (im Uhrzeigersinn) hin. Die Fehlerindikatoren geben die mittleren Standardfehler an.

3.2.1.2. BoNT-A bei 6-OHDA-hemiläsionierten Ratten

Nach einseitiger Läsion der Tiere mittels 6-OHDA-Injektion in das rechte MVB wurden die Ratten in drei Gruppen eingeteilt, deren mittlere apomorphininduzierte Rotationszahlen (und Standardabweichungen) sich glichen, so dass es keine signifikanten Unterschiede in den

Ergebnisse

Rotationsergebnissen der Gruppen gab (**Tabelle 7A**). Je eine Gruppe erhielt 1 ng bzw. 2 ng BoNT-A in das rechte Striatum. Eine dritte diente als Kontrollgruppe, der die Vehikelsubstanz in das rechte Striatum injizierte wurde. Die Gruppe, die nach Läsion 1 ng BoNT-A erhalten hatte, rotierte im Schnitt $9,75 \pm 3,16$ Mal in der Minute, die 2 ng-Gruppe $10,13 \pm 4,74$ U/min und die Kontrollgruppe mit $9,91 \pm 3,16$ U/min. Diese Tiere unterzog man einen, drei, sechs und teilweise bis zu neun und zwölf Monate nach BoNT-A-Behandlung dem apomorphininduzierten Rotationstest.

Desweiteren wurden in einem ähnlichen Experiment 14 Ratten ebenfalls mittels 6-OHDA einseitig läsiert. Diesen wurden vier Wochen nach Läsion 100 pg BoNT-A injiziert. Die Rotationsergebnisse dieser Tiere wurden vier Wochen nach Läsion, sowie einen Monat und zwei Monate nach BoNT-A-Applikation ermittelt.

Eine fünfte Versuchstiergruppe, bestehend aus acht Wistar-Ratten, diente als Doppelkontrolle, d.h. dass bei diesen Tieren zunächst ohne jegliche vorherige Behandlung die Apomorphin-induzierten Rotationen gemessen wurden, danach wurde den Tieren zunächst nur die Vehikelsubstanz des 6-OHDA in das rechte MVB injiziert, vier Wochen danach unterzog man diese Tiere wieder einem Apomorphinrotationstest und schließlich injizierte man ihnen die Vehikelsubstanz des BoNT-A in das rechte CPU und ermittelte nun die apomorphininduzierten Rotationswerte nach einem Monat, zwei Monaten, drei Monaten, sechs Monaten und zwölf Monaten. Diese Tiergruppe ebenso wie die Gruppe, die einseitig läsiert worden war, jedoch nur schein-BoNT-A-behandelt wurde, diente der Ermittlung des Einflusses der operationsbedingten mechanischen Irritationen im Gehirn auf die Rotationsergebnisse.

Aus den Gruppen, die mit 1 ng BoNT-A behandelt wurden, wurden in Abständen von einem Monat, zwei Monaten, drei Monaten, sechs Monaten und zwölf Monaten jeweils 6 - 8 Tiere entnommen und einer histologischen Untersuchung zugeführt, so dass sich die Zahl der Individuen (N; **Diagramm 3; Tabelle 7A**) stetig verringerte. Die Individuen für diese jeweiligen Tierentnahmen wurden vor der BoNT-A-Behandlung in Untergruppen eingeteilt und nach ihrer mittleren apomorphininduzierten Rotationsrate geordnet, so dass es auch in diesen sechs Untergruppen keine signifikanten Unterschiede in der mittleren Rotationszahl zueinander und zu den anderen beiden Gruppen gab. Einen Monat nach Applikation von 1 ng BoNT-A sank die mittlere Zahl der Umdrehungen in der Minute hochsignifikant von $9,75 \pm 3,16$ auf $-1,44 \pm 3,41$. Die Tiere neigten nun also sogar dazu, etwas in die entgegengesetzte Richtung, also im Uhrzeigersinn zu rotieren. In den darauffolgenden Rotationsmessungen der nächsten Monate stieg die Zahl der Rotationen in der Minute wieder stetig an und erreichte

Ergebnisse

nach einem Jahr wieder einen Wert von $5,73 \pm 3,72$ U/min, lag jedoch immer noch hochsignifikant unter dem Ausgangswert (**Diagramm 2, Tabelle 7A**). Die Rotationsergebnisse für läionierte Ratten, die 2 ng BoNT-A erhielten, stellten sich ähnlich dar (**Diagramm 3, Tabelle 7A**). Läionierte Ratten, die lediglich mit einer intrastriatalen Infusion von 100 pg BoNT-A behandelt wurden, zeigten ebenfalls ein verringertes Rotationsverhalten, jedoch waren die beobachteten Veränderungen nur gering und nicht signifikant (**Tabelle 7A**) und unterschieden sich kaum von der Scheinbehandlung.

Die Tiere, deren SN einseitig mit 6-OHDA läioniert wurde, die jedoch nur mit der Vehikelsubstanz des BoNT-A intrastriatal behandelt wurden, wiesen nach der Läsion ein deutliches apomorphininduziertes Rotationsverhalten von $9,91 \pm 3,16$ U/min auf, das sich nach Schein-BoNT-A-Gabe signifikant um ca. 3 U/min verringerte (**Diagramm 4, Tabelle 7A**). Dieser Rückgang der apomorphininduzierten Rotationen war jedoch nicht so stark ausgeprägt, wie der bei BoNT-A-behandelten Tieren. So unterschieden sich die Rotationsergebnisse der BoNT-A-behandelten Ratten und der schein-BoNT-A-behandelten Ratten drei Monate nach Behandlung teils hochsignifikant voneinander (**Diagramm 5**).

Tiere der Doppel-Kontrollgruppe wiesen weder nach Scheinläsion, noch nach Schein-BoNT-A-Behandlung signifikantes apomorphininduziertes Rotationsverhalten auf (**Tabelle 7A**).

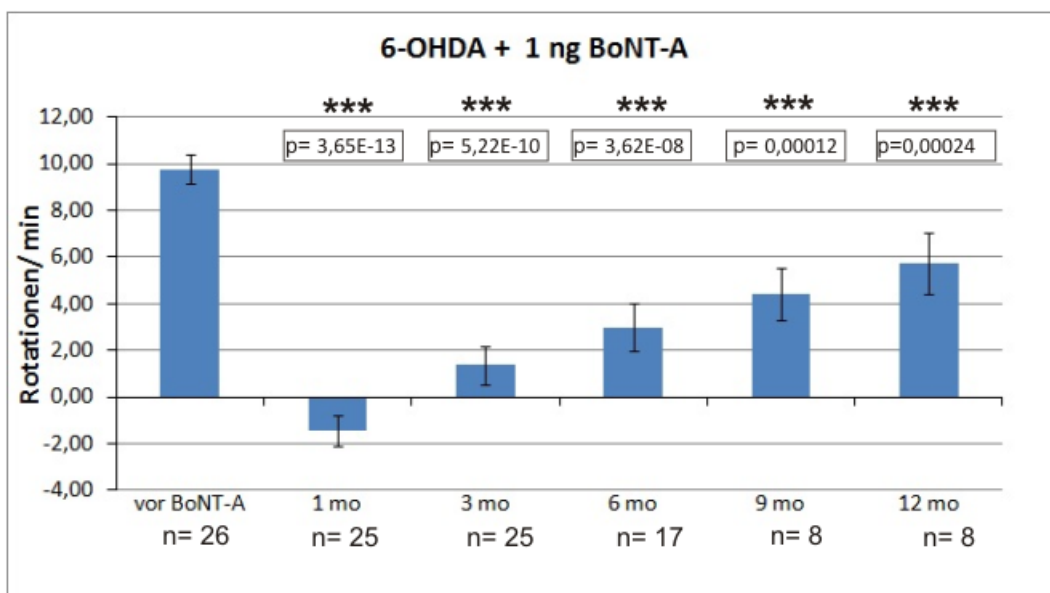


Diagramm 2.: Apomorphininduzierte Rotationen (0,25mg/kg Apomorphin, 40 min) 6-OHDA-hemiläsionierter Ratten vor und nach Behandlung mit 1 ng BoNT-A

Der erste Wert stellt den Durchschnitt der Ergebnisse einer Messung vier Wochen nach Läsion und kurz vor der BoNT-A-Behandlung dar. Auf diesen Wert beziehen sich auch die Signifikanzwerte, die mittels eines gepaarten T-Testes nach Student ermittelt wurden und immer dann angegeben wurden, wenn eine Signifikanz ($p \leq 0,05$) des Unterschiedes zu dem jeweiligen darauffolgenden Durchschnittswert gegeben war.

Eine Applikation von 6-OHDA in das rechte mediale Vorderhirnbündel (MVB) führte zu einem deutlichen Rotationsverhalten von acht bis zehn Umdrehungen in der Minute unter Apomorphineinfluss in die

Ergebnisse

kontralaterale Richtung zur Injektionsseite (entgegen dem Uhrzeigersinn). Bei Ratten, denen vier Wochen nach Läsion 1 ng BoNT-A in das rechte Striatum injiziert wurde, gingen die apomorphininduzierten Rotationen für mindestens drei Monate komplett zurück, um sich im Verlauf von zwölf Monaten dem Ausgangswert wieder anzunähern, jedoch nach wie vor hoch signifikant unter diesem zu bleiben. Der Fehlerindikator gibt den mittleren Standardfehler an. Alle Werte sind in **Tabelle 7A** angegeben. *** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

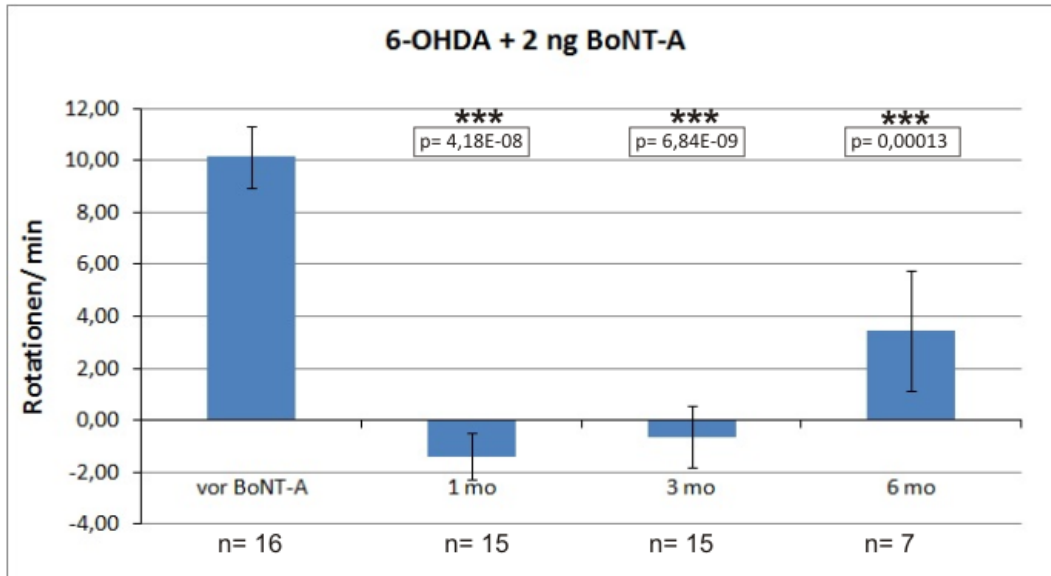


Diagramm 3.: Apomorphininduzierte Rotationen (0,25mg/kg Apomorphin, 40 min) 6-OHDA-hemiläsionierter Ratten vor und nach Behandlung mit 2 ng BoNT-A

Die intrastriatale Infusion von hemiläsionierten Ratten mit 2 ng BoNT-A ipsilateral zur Läsion, führt über mindestens sechs Monate hinweg zu einem hochsignifikanten und nahezu vollständigem Rückgang der apomorphininduzierten Rotationen. Der Fehlerindikator gibt den mittlern Standardfehler an. Die Werte sind in **Tabelle 7A** angegeben.

*** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

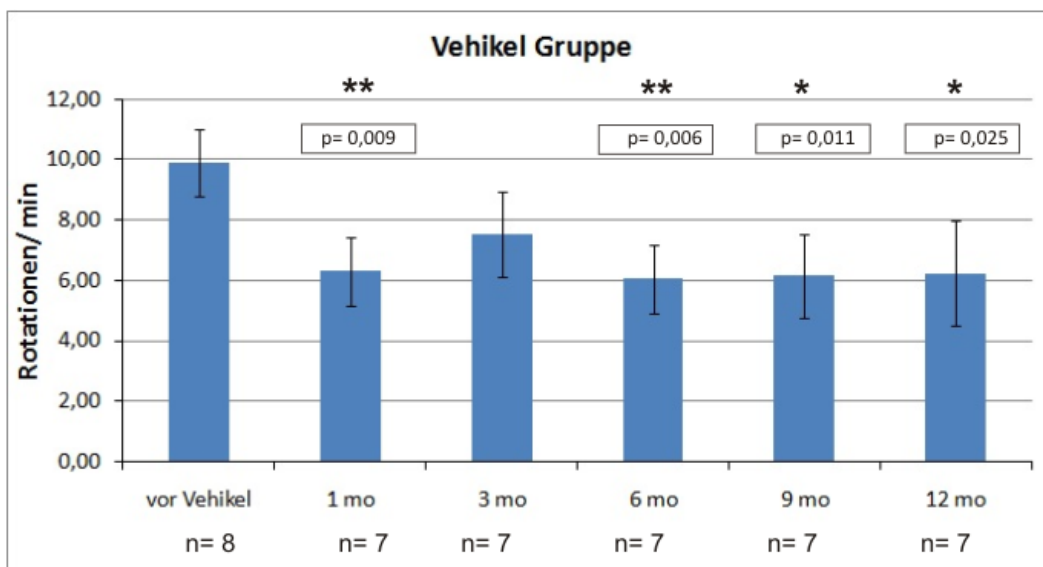


Diagramm 4.: Apomorphininduzierte Rotationen (0,25mg/kg Apomorphin, 40 min) 6-OHDA-hemiläsionierter Ratten vor und nach Schein-BoNT-A-Behandlung

Die Läsion der SN durch 6-OHDA führt zu einem starken apomorphininduzierten Rotationsverhalten. Deutlich wird, dass auch eine Schein-BoNT-A-Behandlung zu einer signifikanten Verringerung der Rotationsrate

Ergebnisse

hemiläsionierter Ratten führt. Diese erreicht jedoch bei Weitem nicht das Ausmaß der BoNT-A-Behandlung (**Diagramm 5**). Alle Werte sind in **Tabelle 7A** angegeben.

Der Fehlerindikator gibt den mittleren Standardfehler an. * = signifikant ($0,01 < p \leq 0,05$); ** = sehr signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$)

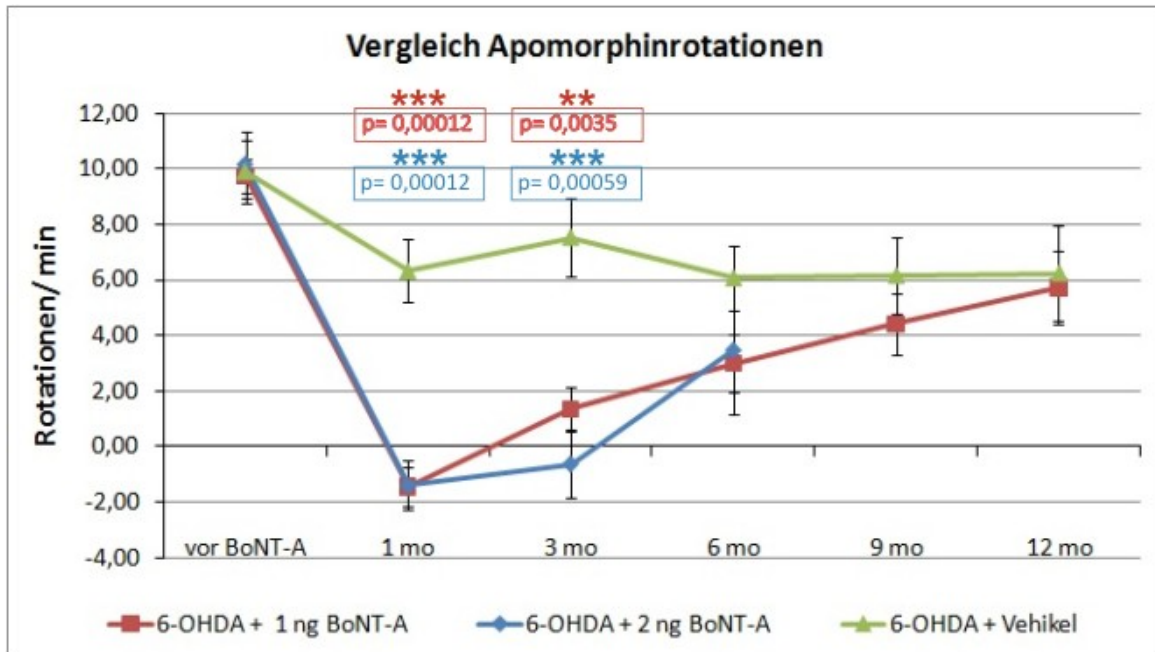


Diagramm 5.: Vergleich des apomorphininduzierten Rotationsverhaltens der Versuchstiergruppen

Die Signifikanzwerte mit einer roten Schriftfarbe beziehen sich auf die Ermittlung eines Unterschiedes durch einen ungepaarten T-Test zwischen den Messwerten der Tiere, denen nach 6-OHDA-Läsion 1 ng BoNT-A je CPU injiziert wurde und den Tieren, denen nur die Vehikelsubstanz des BoNT-A injiziert wurde, zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die blau markierten Signifikanzwerte beziehen sich auf den Vergleich der 6-OHDA-läsionierten Tiere, die mit 2 ng BoNT-A behandelt wurden, mit den läsionierten Tieren, die nur schein-BoNT-A behandelt wurden. Ist kein Signifikanzwert angegeben, so waren die Unterschiede der Rotationsgeschwindigkeiten der Tiergruppen auch nicht signifikant.

Eine Applikation von 6-OHDA in das rechte MVB führte zu einem deutlichen Rotationsverhalten von acht bis zehn Umdrehungen in der Minute unter Apomorphineinfluss in die kontralaterale Richtung zur Injektionsseite (entgegen dem Uhrzeigersinn) bei allen Tiergruppen. Deutlich ist zu erkennen, dass bis zu drei Monate nach intrastriärer Applikation von 1 ng oder 2 ng BoNT-A die Rotationsgeschwindigkeit der entsprechenden Tiere sehr signifikant bzw. sogar hoch signifikant geringer ist als die der läsionierten Tiere, die nur schein-BoNT-A behandelt wurden. Auch danach bleibt ein Trend bestehen, dass Tiere die BoNT-A-behandelt wurden, langsamer unter Apomorphin rotieren.

Der Fehlerindikator zeigt den jeweiligen mittleren Standardfehler an. ** = sehr signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$); *** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

3.2.2. Amphetaminrotationstest

3.2.2.1. Nur BoNT-A behandelte Ratten

Im Amphetaminrotationstest wiesen gesunde Wistar-Ratten, denen man in das rechte Striatum entweder 100 pg, oder 1 ng BoNT-A injiziert hat, kein Rotationsverhalten auf. Lediglich bei der Injektion von 2 ng BoNT-A zeigten die Tiere teilweise ein Rotationsverhalten von ein bis

Ergebnisse

zwei Umdrehungen ipsilateral zur Injektionsseite, also im Uhrzeigersinn. Diese Beobachtung war jedoch nicht immer reproduzierbar (**Tabelle 8A**).

3.2.2.2. BoNT-A bei 6-OHDA-hemiläsionierten Ratten

Eine intraperitoneale Injektion von 2,5 mg Amphetamin je kg KG führte bei Wistar Ratten, deren rechtes Striatum durch 6-OHDA dopaminerg deafferentiert worden ist, zu ca. acht Drehbewegungen in der Minute mit dem Uhrzeigersinn, also zu der läsionierten Seite hin. Weder eine intrastriatale Applikation von 100 pg, noch 1 ng oder 2 ng BoNT-A führte zu einem Rückgang amphetamininduzierter Rotationen. Bei Tieren, die mit 2 ng BoNT-A behandelt wurden, stieg diese sogar um vier U/min. Die Änderungen waren bis zu zwei Monate nach Behandlung stark signifikant (**Diagramm 6; 7; 8; Tabelle 9A**). Ein signifikanter Unterschied zu hemiläsionierten und scheinbehandelten Tieren bestand aber zu keinem Zeitpunkt (**Diagramm 9**).

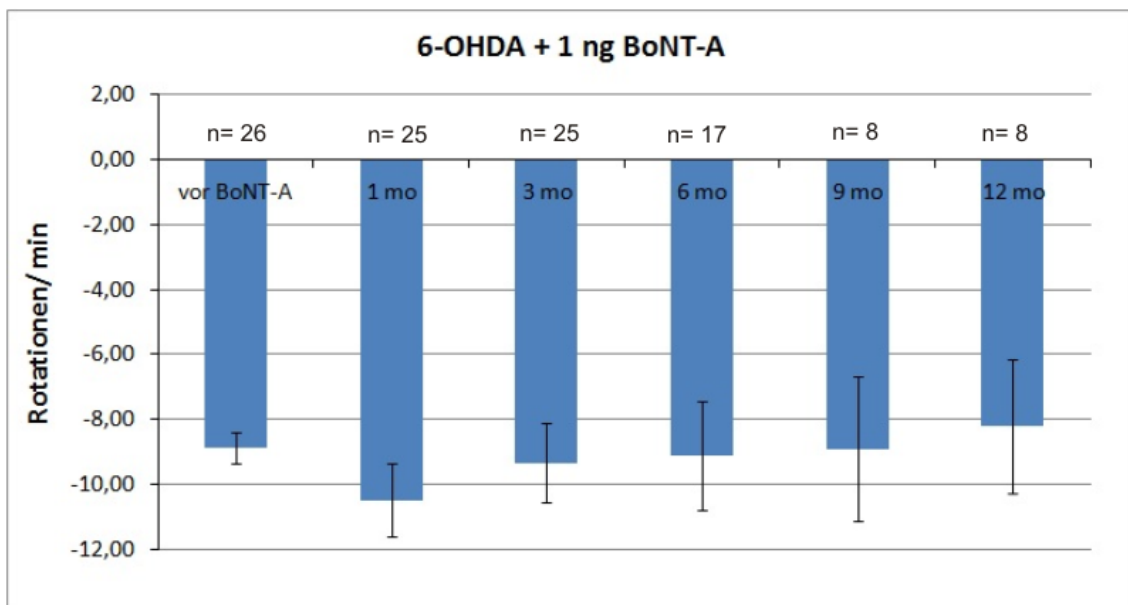


Diagramm 6.: Amphetamininduzierte Rotationen (2,5 mg/ kg, 60 min) 6-OHDA-hemiläsionierter Ratten vor und nach intrastriatale Behandlung mit 1 ng BoNT-A

Die intrastriatale Applikation von 1 ng BoNT-A führte zu keiner Beeinflussung der amphetamininduzierten Rotationen hemiläsionierter Ratten. Der Fehlerindikator gibt den mittleren Standardfehler an.

Ergebnisse

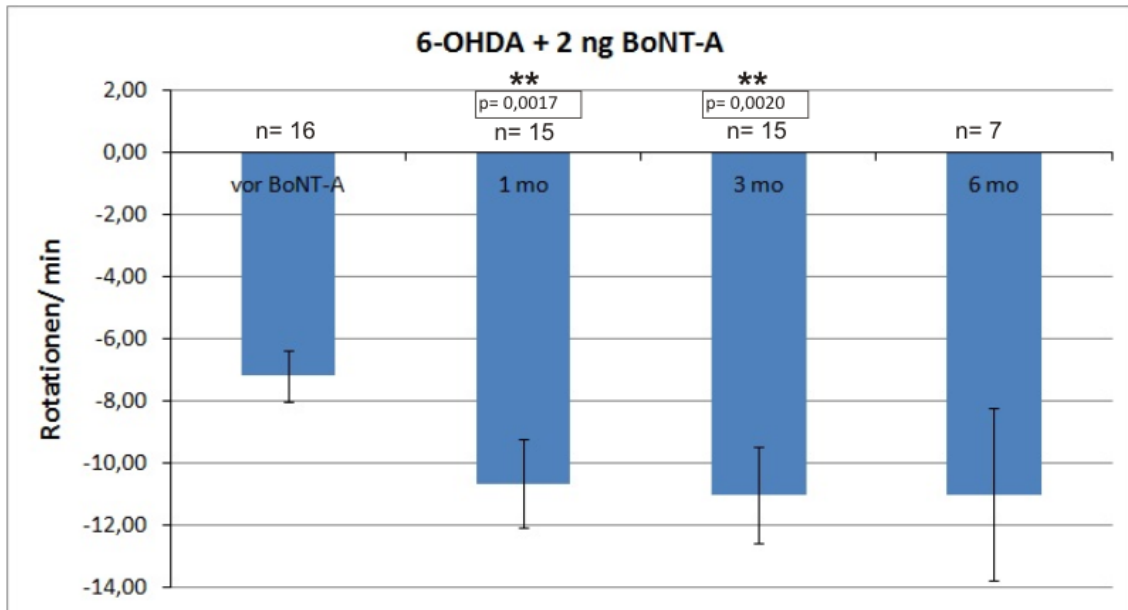


Diagramm 7.: Amphetamininduzierte Rotationen (2,5 mg/ kg, 60 min) 6-OHDA-hemiläsionierter Ratten vor und nach intrastriärer Behandlung mit 2 ng BoNT-A

Die angegebenen Signifikanzen über den jeweiligen Werten beziehen sich jeweils immer auf eine Signifikanztestung nach Student mit dem Wert, der vor der BoNT-A-Injektion gemessen wurde.

Die Injektion von 2 ng BoNT-A in das rechte CPu von Wistar-Ratten, deren rechte SN mittels 6-OHDA läsiert worden ist, führte zu einer sehr signifikant erhöhten Rotationsrate in den ersten drei Monaten nach der Behandlung. Auch ein halbes Jahr nach BoNT-A-Applikation blieb ein Trend zu vermehrten Rotationen in der Minute nach Amphetamingabe bestehen. ** = sehr signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$)

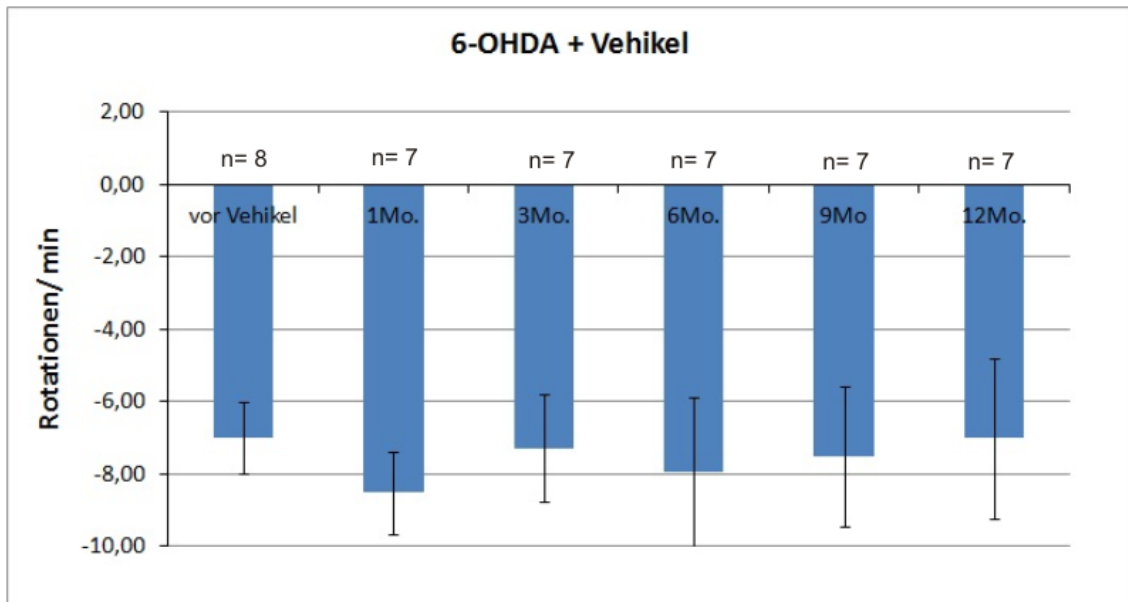


Diagramm 8.: Amphetamininduzierte Rotationen (2,5 mg/ kg, 60 min) 6-OHDA-hemiläsionierter Ratten vor und nach Schein-BoNT-A-Behandlung

Nach einer 6-OHDA-Läsion der rechten SN zeigen die Tiere nach Gabe von Amphetamin ein deutliches Rotationsverhalten in ipsilaterale Richtung zur Läsion (im Uhrzeigersinn). Dieses wurde durch eine schein-BoNT-A-Behandlung nicht beeinflusst. Der Fehlerindikator gibt den mittleren Standardfehler an.

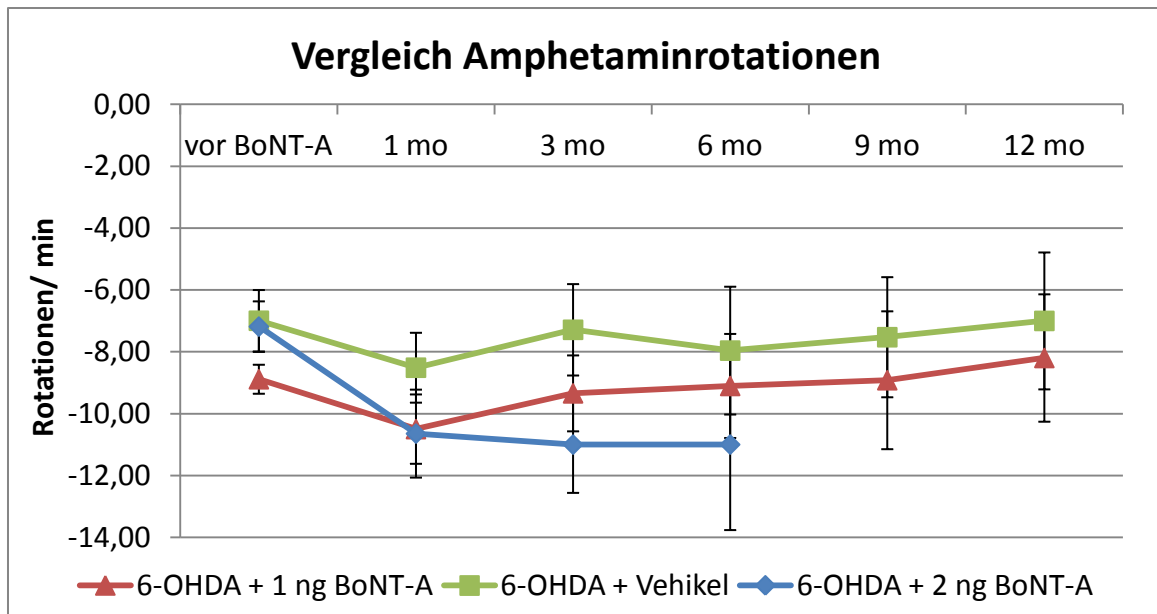


Diagramm 9.: Vergleich der amphetamininduzierten Rotationen der verschiedenen Versuchstiergruppen
 Dargestellt sind im Vergleich die mittleren amphetamininduzierten Rotationen, der Tiergruppen, die nach 6-OHDA-Läsion entweder intrastriatal mit 1 ng BoNT-A, 2 ng BoNT-A oder scheinbehandelt wurden. Zu keinem Zeitpunkt gab es zwischen den Versuchstiergruppen signifikante Unterschiede.

3.3. Nicht-pharmakainduzierte motorische Verhaltenstests

3.3.1. Zylindertest

3.3.1.1. Scheinläsionierte- und schein BoNT-A-behandelte Ratten

Aus den Zylindertestwerten der doppelt-scheinoperierten Tiere, die zu einem Zeitpunkt getestet wurden, an dem sie noch keiner Operation unterzogen wurden, wird deutlich, dass gesunde Wistar-Ratten dazu neigen eher ihre linke Pfote bei spontanem ungezwungenem Gebrauch zu benutzen. Im Mittel ergab sich hier ein Quotient von linkem und rechtem Vorderpfotengebrauch (l/r-Quotient) von $1,54 \pm 0,86$. Auch nach Scheinläsion bleibt eine Präferenz zum Gebrauch der linken Vorderpfote bestehen, was sich in einem l/r-Quotienten von $2,12 \pm 2,36$ äußert. Eine Injektion der Vehikelsubstanz von BoNT-A in das Striatum führt zu einer tendenziellen Verminderung der Linkspräferenz über eine längere Zeitspanne hinweg (**Diagramm 10**). Die operationsbedingte Irritation des rechten CPU's, scheint also einen Effekt auf die Händigkeit der Tiere zu haben. Nichts desto trotz entwickeln die Tiere keine (klare) Rechtspräferenz.

Deutlich ist in **Diagramm 11** zu sehen, dass die rechtsseitige 6-OHDA-Läsion bei den Tieren eine signifikante Präferenz des Gebrauchs der rechten Vorderpfote bewirkt ($p = 0,0099$). Im Schnitt verwenden die Tiere nach Läsion ihre rechte Vorderpfote doppelt so häufig wie ihre linke Vorderpfote (l/r-Quotient ca. bei 0,5).

Ergebnisse

Durch eine intrastriatale BoNT-A-Behandlung scheint diese Rechtspräferenz abzunehmen, jedoch geschieht dies nur zeitlich begrenzt und nicht signifikant. Bei der Behandlung mit 2 ng BoNT-A reduziert sich die Rechtspräferenz nach 3 Monaten stark signifikant (**Diagramm 12**). Wichtig ist es hierbei zu erwähnen, dass auch bei läsierten Tieren, die nur einer Schein-BoNT-A-Behandlung unterzogen worden, ein Trend zur Reduktion der Rechtspräferenz zu erkennen ist (maximal 0,86 nach 3 Monaten), der l/r-Quotient nach 9 Monaten aber wieder auf einen Wert von 0,61 zurückkehrt (**Diagramm 13**).

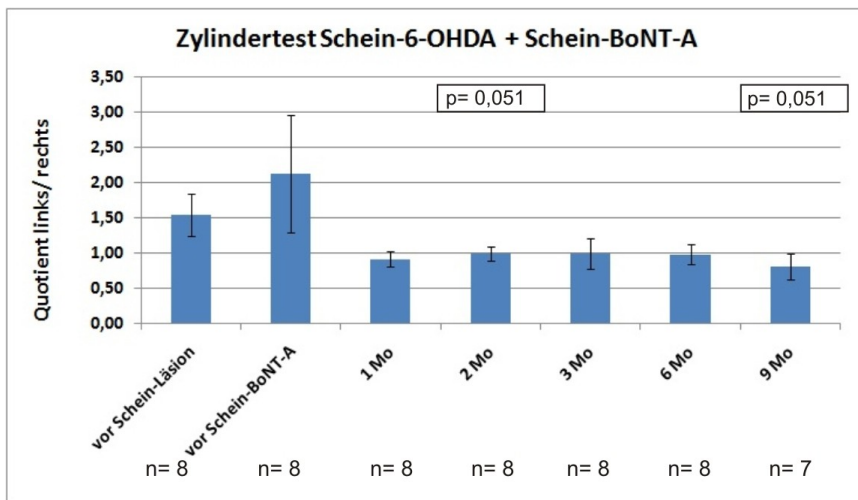


Diagramm 10.:

Zylindertestergebnisse scheinläsionierter Ratten, die einer Schein-BoNT-A-Behandlung unterzogen wurden (l/r-Quotienten von insgesamt 30 Wandberührungen)

Ein Quotient von 0 entspräche also 30 rechtsseitigen Wandberührungen bei keiner

linksseitigen Wandberührung, ein Quotient der sich 30 annähert, würde für eine nahezu alleinige Verwendung der linken Pfote sprechen. Es fällt auf, dass gänzlich unbehandelte Wistar Ratten vermehrt die linke Pfote verwenden. Nach einer Schein-BoNT-A-Behandlung stellt sich ein deutlicher Trend ($p=0,051$ zwei Monate nach Schein-BoNT-A-Injektion) zu einer Angleichung des Links- und Rechtspfotengebrauchs ein, teilweise wird nun sogar vermehrt die rechte Pfote verwendet ($l/r\text{-Quotient} \leq 1$). Die Fehlerindikatoren repräsentieren den mittleren Standardfehler.

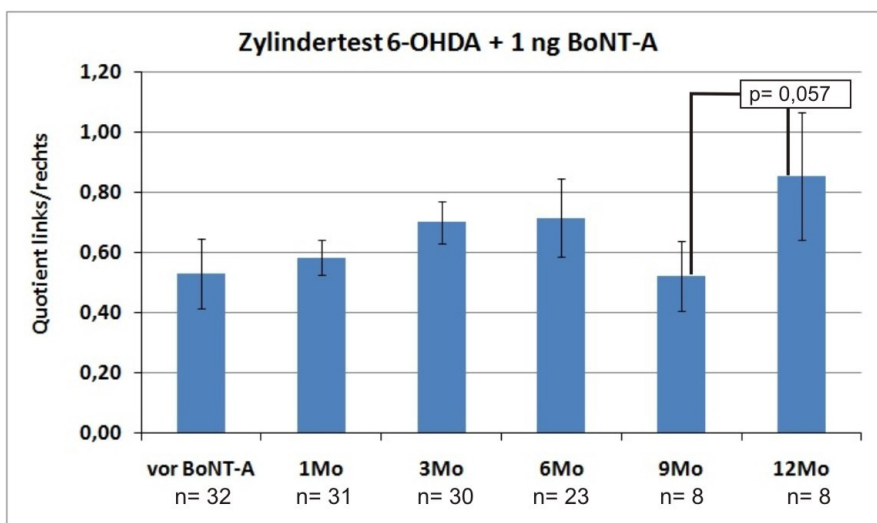


Diagramm 11.:

Zylindertestergebnisse 6-OHDA-hemiläsionierter Ratten, die einer intrastriatalen Behandlung mit 1 ng BoNT-A unterzogen wurden

Dargestellt sind die mittleren l/r-Quotienten von Versuchstieren, die zunächst mittels 6-OHDA hemiläsioniert und später intrastriatal mit 1 ng BoNT-A behandelt

wurden. Die Applikation von 1 ng hat keinen signifikanten Einfluss auf die Händigkeit der Versuchstiere. Lediglich bei dem Vergleich der neun Monate und zwölf Monate nach BoNT-A-Behandlung ermittelten l/r-Quotienten besteht ein deutlicher Trend zu einer Angleichung des Vorderpfotengebrauchs. Die Fehlerindikatoren repräsentieren den mittleren Standardfehler.

Ergebnisse

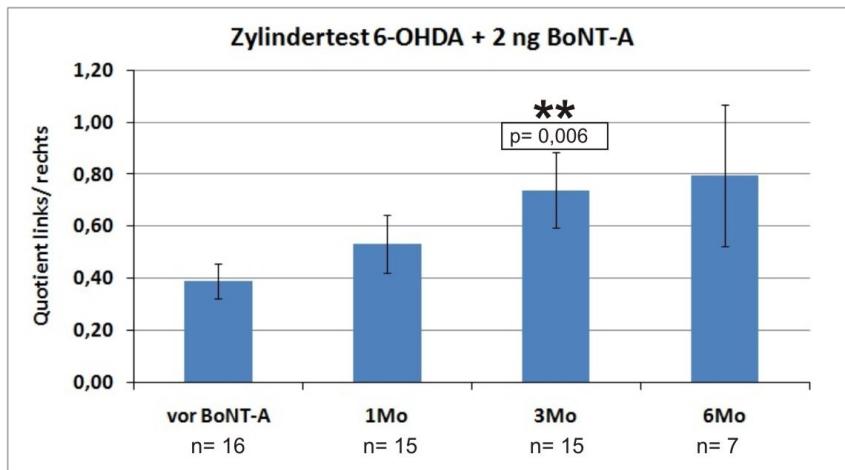


Diagramm 12.:

Zylindertestergebnisse (mittlere l/r-Quotienten) 6-OHDA-hemiläsionierter Ratten, die einer intrastriatalen Behandlung mit 2 ng BoNT-A unterzogen wurden

Drei Monate nach BoNT-A-Behandlung gleichen sich Links- und Rechtspfotengebrauch wieder

stark signifikant an. Die Fehlerindikatoren repräsentieren den mittleren Standardfehler. ** = sehr signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$)

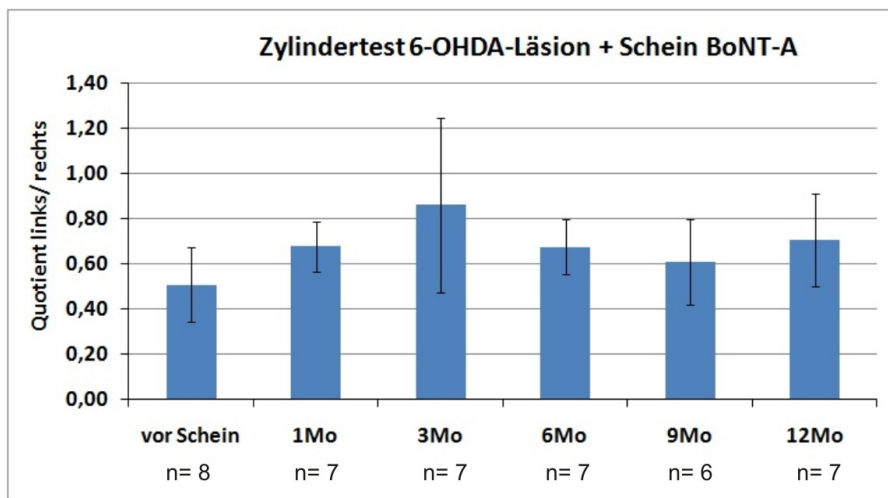


Diagramm 13.:

Zylindertestergebnisse 6-OHDA-hemiläsionierter Ratten, die einen Monat nach Läsion einer Schein-BoNT-A-Behandlung unterzogen wurden

Die l/r-Quotient blieb von der BoNT-A-Injektion unbeeinflusst. Die Fehlerindikatoren

repräsentieren den mittleren Standardfehler.

3.3.2. Accelerod-Test (forcierter motorischer Test)

3.3.2.1. 6-OHDA-läsionierte + BoNT-A-behandelte Ratten

Hier ist sowohl den 6-OHDA-läsionierten und BoNT-A-behandelten Tieren als auch den 6-OHDA-läsionierten und Schein-BoNT-A-behandelten Tieren und den scheinläsionierten-schein-BoNT-A-behandelten Tieren zu Eigen, dass die Performance der Tiere auf dem Accelerod mit steigendem Alter abnimmt. Diese Entwicklung ist für läsionierte BoNT-A-behandelte und Schein-Schein-Tiere hochsignifikant. Bei läsionierten scheinbehandelten Tieren zeigt sich ein gleichartiger Trend. Jedoch gibt es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der durchschnittlichen verstrichenen Zeit, in dem zurückgelegten Weg der Tiere oder der Geschwindigkeit der Walzen beim Sturz zwischen den einzelnen Tiergruppen (Tabellen 10A - 12A).

Ergebnisse

Aus den gewonnenen Daten lässt sich schließen, dass läsionierte Ratten durch intrastriatale Applikation von BoNT-A keine Verbesserung ihrer Fähigkeit erlangen, aufgezwungene Bewegungsabläufe dauerhaft durchzuführen. Deutlich ist in dem **Diagramm 14** und den **Tabellen 10A - 21A** zu erkennen, dass es einen Monat nach BoNT-A-Injektion zu keinem Abfall, jedoch auch zu keiner Verbesserung der Leistung der verschiedenen Tiergruppen auf dem Accelerod kommt. Zu diesem Zeitpunkt jedoch ist die Wirkung des BoNT-A im Striatum auf das extrapyramidale motorische System am stärksten, was wir durch die dramatische Abnahme an Rotationen im apomorphininduzierten Rotationstest deutlich zeigen konnten (**Diagramm 5**).

Schon zwei Monate später lässt die Leistung dieser Tiere auf dem Accelerod sogar signifikant nach, jedoch unterscheiden sich die BoNT-A-behandelten Tiere nicht von den Tieren der Kontrollgruppen, denn auch hier nehmen die Leistungen der Tiere auf dem Accelerod, wenn auch nicht immer signifikant, ab. Es besteht also keine Korrelation zwischen BoNT-A-Applikation und Performanceabnahme auf dem Accelerod, jedoch besteht ein deutlicher Zusammenhang mit dem steigenden Alter der Tiere. Auch auf die 6-OHDA-Läsion ist dieser stetige Leistungsabfall nicht zurückzuführen, denn scheinläsionierte Tiere zeigen genau dieselbe Entwicklung (**Diagramm 14**).

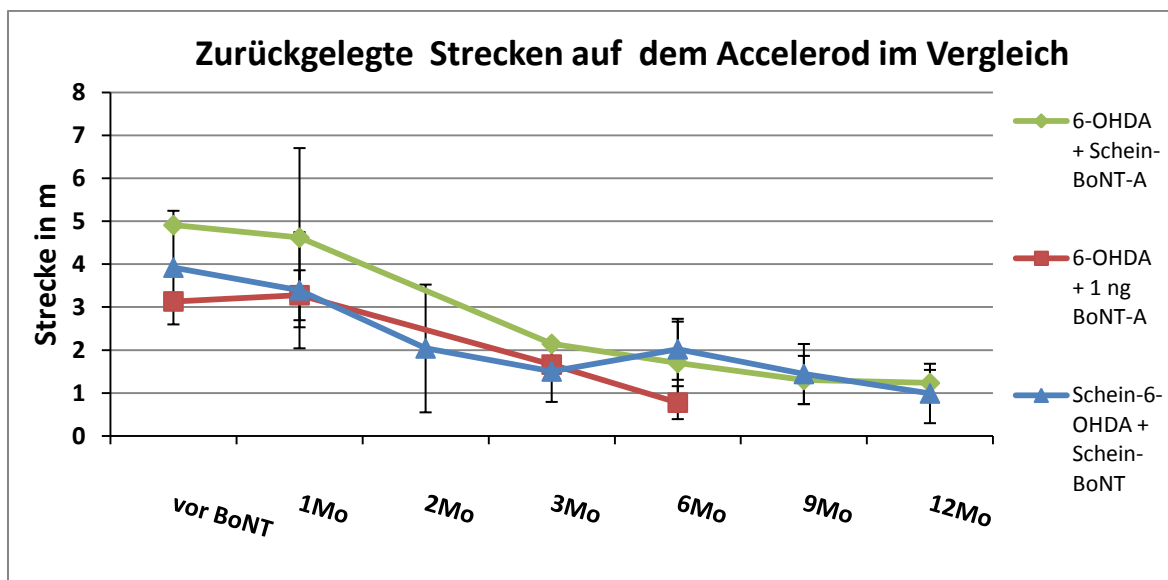


Diagramm 14.: Altersabhängige Leistungsabnahme im Accelerod-Test bei allen Tiergruppen

Exemplarisch sind hier die mittleren zurückgelegten Strecken auf dem Accelerod der 6-OHDA-läsionierten und BoNT-A-behandelten Tiergruppe und der scheinbehandelten Tiergruppe als auch der scheinläsionierten und scheinbehandelten Tiergruppe zu allen Testzeitpunkten aufgeführt. Alle Tiergruppen nehmen mit steigendem Alter an Leistung auf dem Accelerod ab und fallen zunehmend früher von der sich beschleunigend rotierenden Walze. Zu keinem Zeitpunkt gab es signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen. Die Fehlerindikatoren geben die mittleren Standardfehler an.

3.3.2.1. Bilateral BoNT-A-behandelte Ratten

In einer zweiten Versuchsreihe wurden Versuchsratten getestet, die in drei Gruppen unterteilt wurden. Hier wurde einer Gruppe sowohl in das rechte, als auch in das linke Striatum jeweils 1 ng BoNT-A injiziert. Einer weiteren Gruppe wurde lediglich beidseitig die Vehikellösung injiziert und eine dritte Gruppe blieb gänzlich unbehandelt.

Das Prozedere des Trainings und des Testes war analog zu dem Accelerod-Test, der oben beschrieben wurde und begann sieben Wochen nach der Operation. Die Testung erfolgte hier allerdings nicht nur an einem Tag, sondern über vier Tage hinweg. Der Ablauf der Testdurchgänge war jedoch derselbe wie oben und erfolgte zwei Mal am Tag.

Während des Trainings fielen die beidseitig mit BoNT-A behandelten Tiere signifikant früher von der Walze als gänzlich unbehandelt Tiere. Auch war während des Trainings die Zahl der Stürze von der Walze bei BoNT-A-behandelten Tieren signifikant höher als bei unbehandelten Kontrolltieren (**Diagramm 15A + B; Tabelle 22A**). Auch scheinbehandelte Tiere schneller und öfter von der Walze als unbehandelte Tiere, diese Unterschiede waren nur zum Teil und nicht für alle Trainingstage signifikant. Im direkten Vergleich von beidseitig BoNT-A-behandelten Tieren und beidseitig scheinbehandelten Tieren, zeigten BoNT-A behandelte Tiere ebenfalls zum Teil eine sehr signifikant schwächere Leistung auf dem Accelerod, was sich in vermehrten und früheren Stürzen während des Trainings äußerte (**Diagramm 15A + B; Tabelle 22A**).

Alle Tiere konnten ihre Leistungen durch Training auf der Walze verbessern.

Während der eigentlichen Testung hielten sich BoNT-A-behandelte Tiere signifikant kürzer auf dem Accelerod und dies sowohl bezüglich der unbehandelten Kontrolltiere als auch der scheinbehandelten Tiere (**Diagramm 16**).

Ergebnisse

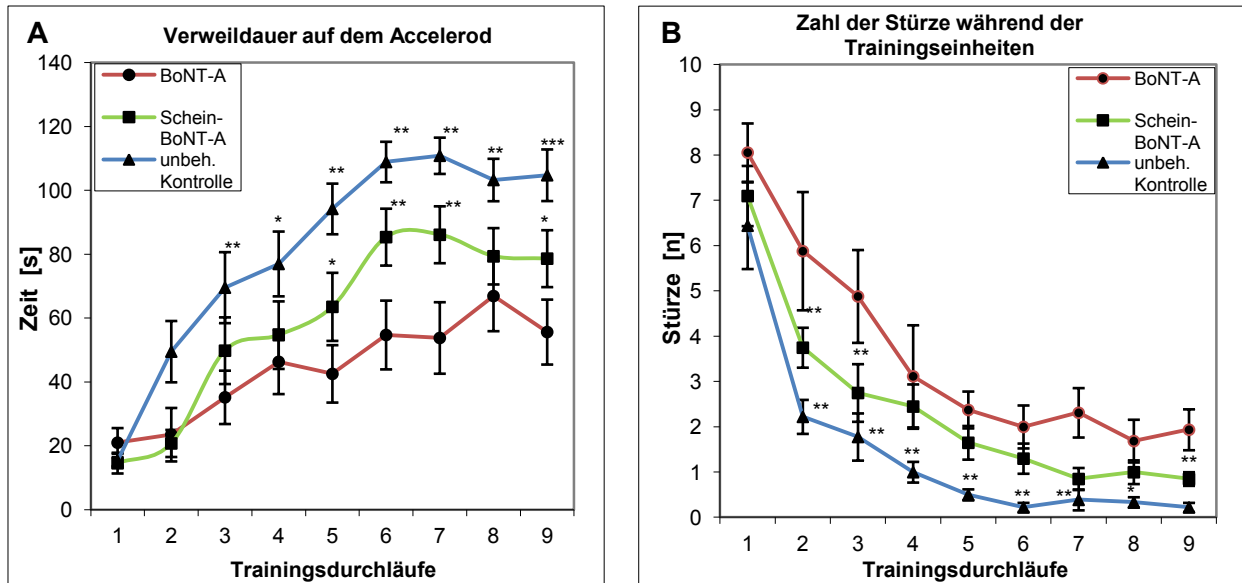


Diagramm 15.: Trainingsverläufe auf dem Accelerod für bilaterale BoNT-A-behandelte Ratten bzw. Kontrollen

Aufgeführt sind die Lernkurven der beidseitig BoNT-A-behandelten Ratten, der scheinbehandelten Ratten und der unbehandelten Kontrollen auf der Accelerod-Apparatur.

Diagramm A führt die durchschnittlich auf der Walze verbrachten Zeiten bis zum ersten Sturz für jeden Trainingstag auf.

Diagramm B führt die durchschnittliche Anzahl der Stürze von der Walze für jeden Trainingstag auf * = signifikant ($0,01 < p \leq 0,05$); ** = sehr signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$); *** = hochsignifikant ($p \leq 0,001$)

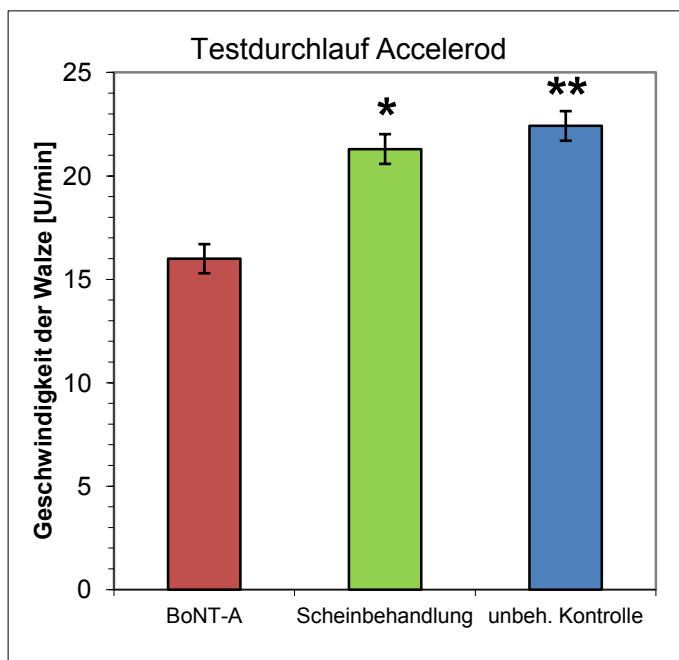


Diagramm 16.: Testung bilaterale BoNT-A-behandelter (unläsionierter) Tiere auf dem Accelerod

Dargestellt sind hier die mittleren Umdrehungsgeschwindigkeiten der sich beschleunigend drehenden Walze des Accelerod, bei dem es zum Sturz der jeweiligen Tiere während des eigentlichen Testdurchlaufes kam. Es wird deutlich, dass bilaterale BoNT-A-behandelte Tiere gegenüber scheinbehandelten Ratten bei signifikant, gegenüber unbehandelten Kontrollen sogar sehr signifikant niedrigeren Geschwindigkeiten von der Walze fallen. Der Fehlerindikator gibt den mittleren Standardfehler an. * = signifikant ($0,01 < p \leq 0,05$); ** = sehr signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$)

3.3.3. Testung der spontanen motorischen Aktivität, des Explorationsverhaltens und der Angst mittels des Open Field

3.3.3.1. Open-Field-Test bei 6-OHDA läsierten und BoNT-A-behandelten Ratten

Im Open Field ließ sich bei einseitig läsierten Ratten, einen Monat nach Applikation von sowohl 1 ng als auch 2 ng BoNT-A in das rechte Striatum eine signifikante Verringerung der spontan zurückgelegten Strecke im Vergleich zu den Testungen vor der BoNT-A-Behandlung konstatieren. Diese Verringerung der Laufstrecke setzte sich bis drei Monate nach BoNT-A-Gabe stetig fort und blieb dann konstant (**Tabelle 23A und 24A**). Ähnlich verhielt es sich mit den Kontrolltieren, die läsiert wurden und denen nur die Vehikelsubstanz des BoNT-A injiziert wurde, auch bei ihnen nahm die Strecke des in zehn Minuten zurückgelegten Weges ab, jedoch kam es innerhalb von sechs Monaten wieder zu einer leichten Zunahme der Bewegungsstrecke (**Tabelle 25A**). Auch bei scheinläsierten Ratten nahm die Laufstrecke erst ab, nahm jedoch nach Schein-BoNT-A-Behandlung wieder leicht zu (**Tabelle 26A**).

Bezüglich der zurückgelegten Strecke innerhalb von zehn Minuten gab es zwischen scheinläsierten, schein-BoNT-A-behandelten Tieren und läsierten, 1 ng-BoNT-A- als auch 2 ng-BoNT-A-behandelten Tieren zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

Zwischen der Gruppe der läsierten und schein-BoNT-A-behandelten Tiere und den läsierten, 1 ng-BoNT-A- und 2 ng-BoNT-A behandelten Tieren gab es lediglich nach der Läsion und vor der eigentlichen BoNT-A-Behandlung leichte signifikante Unterschiede, nach BoNT-A bzw. schein-BoNT-A-Behandlung zeigten die Tiere keine signifikanten Unterschiede mehr in der zurückgelegten Strecke (**Diagramm 17; Tabelle 27A**). Hier besteht eine starke Ähnlichkeit zu den Ergebnissen des Accelerod-Testes. Offensichtlich nimmt mit steigendem Alter der Ratten auch die spontane Bereitschaft und/oder Fähigkeit sich in ungewohnter Umgebung zu bewegen und diese zu erkunden ab.

Hinsichtlich des Angstverhaltens konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen einseitig läsierten, einseitig BoNT-A-behandelten Ratten und Kontrollraten festgestellt werden, denn im Schnitt vermieden es alle Tiere gleichermaßen sich in der Mitte des Open-Field aufzuhalten (Daten nicht gezeigt). Eine einseitige intrastriale Applikation von BoNT-A verändert also allem Anschein nach nicht die Bewertung von bestimmten Gefahrensituationen bei Ratten.

Ergebnisse

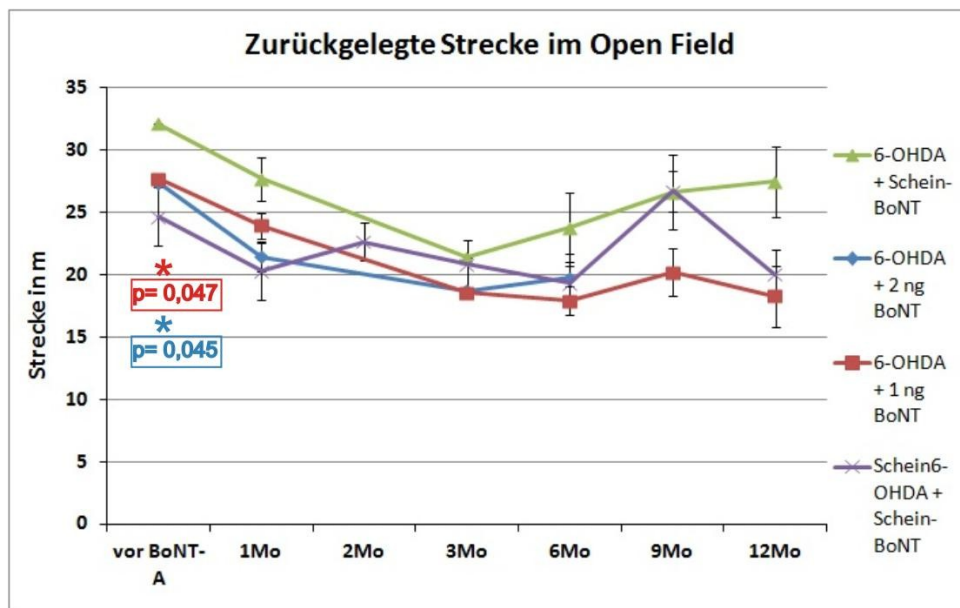


Diagramm 17.: Spontan zurückgelegte Strecken (in m) innerhalb von 10 min im Open-Field-Test der Versuchstiergruppen

Lediglich einen Monat nach 6-OHDA-Läsion, jedoch noch vor der BoNT-A-Behandlung bewegten sich die beiden Tiergruppen, denen später entweder 1 ng oder 2 ng BoNT-A intrastriatal injiziert werden sollten, signifikant weniger weit fort, als die Tiergruppe, die ebenfalls mit 6-OHDA läsioniert worden war, der jedoch später nur die Vehikelsubstanz des BoNT-A injiziert werden sollte. Zu allen anderen Testzeitpunkten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen bezüglich der spontanen motorischen Aktivität im Open Field.

Die Fehlerindikatoren geben den mittleren Standardfehler an.

* = signifikant ($p \leq 0,05$)

3.3.3.2. Open-Field-Test bei bilateral intrastriatal BoNT-A-behandelten Wistar-Ratten

Wie bereits im Methodenteil erwähnt, lag die Prämisse bei der Testung von beidseitig intrastriatal BoNT-A-behandelten Wistar-Ratten in der Analyse eventueller Alterationen des Angstverhaltens gegenüber unbehandelten Ratten oder Kontrollratten. Hierfür wurde der Test dahingehend adaptiert, dass die anxiogenen Eigenschaften der Versuchsanordnung für die Tiere dadurch verstärkt wurden, dass man die Lichtstärke von vormals 2 Lux auf 450 Lux erhöhte und die Tiere nur ein einziges Mal in die Versuchsanordnung gab.

3.3.3.2.1. Analyse des Angstverhaltens

Die Gesamtlaufstrecke in der Versuchsarena war bei bilateral BoNT-A-behandelten Ratten signifikant geringer als bei bilateral schein-BoNT-A-behandelten Ratten und gänzlich unbehandelten Ratten, dies könnte wiederum sowohl ein Zeichen vermehrter Ängstlichkeit sein, als auch ein Zeichen von eingeschränkten motorischen Fähigkeiten (**Diagramm 18**).

Wie in der Beschreibung des Open-Field-Testes dargelegt, fand eine interaktive Unterteilung der Open-Field-Arena in mehrere Quadranten statt. Eine Ratte mit normalem Angstverhalten

Ergebnisse

wird sich vermehrt in den Quadranten aufhalten, die direkt an den Wänden bzw. Ecken des Open Field positioniert sind. Als Maß für die Ängstlichkeit diente ein Quotient aus zurückgelegter Strecke im Zentrum der Open-Field-Arena und der gesamten zurückgelegten Strecke. Je höher der Wert dieses Quotienten war umso geringer muss die Ängstlichkeit dieser Tiere gewesen sein. In nachfolgenden Diagrammen und Tabellen wird dieser Quotient als „Angstquotient“ bezeichnet.

Die BoNT-A behandelten Ratten verbrachten signifikant mehr Zeit im Zentrum des Open Field als die beiden Kontrolltiergruppen (bilateral schein-BoNT-A-behandelte Tiere und gänzlich unbehandelte Tiere), dies spricht im Allgemeinen für weniger Ängstlichkeit der Tiere (**Diagramm 19**). Allerdings zeigten die BoNT-A Tiere im Open Field auch eine signifikant vermehrte Defäkation, im Vergleich zu den Kontrolltiergruppen, was andererseits auf eine höhere Ängstlichkeit hindeutet (**Tabelle 2**).

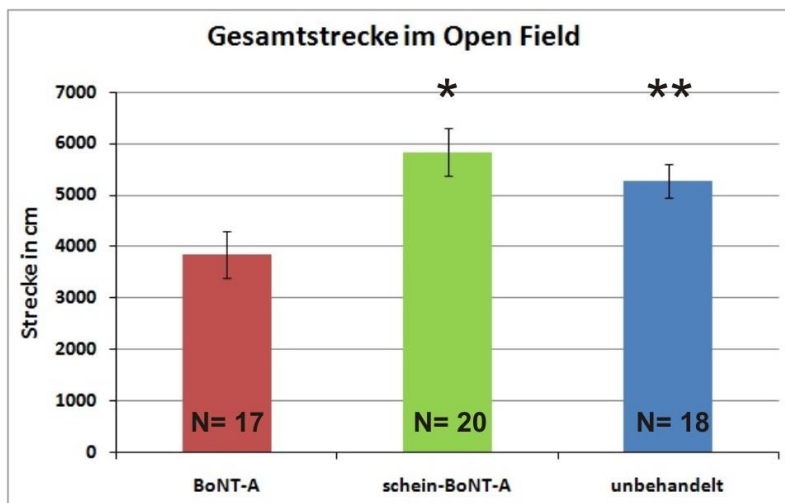


Diagramm 18.: Zurückgelegte Gesamtstrecke im Open Field von bilateral BoNT-A-behandelten Ratten und Kontrollratten

BoNT-A behandelte Ratten bewegen sich in der Open-Field-Arena signifikant weniger weit fort als schein-BoNT-A-behandelte Ratten und sehr signifikant weit weniger als gänzlich unbehandelte Ratten. Die Fehlerbalken entsprechen dem mittleren Standardfehler.

*= signifikant ($0,01 < p \leq 0,05$); ** sehr signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$)

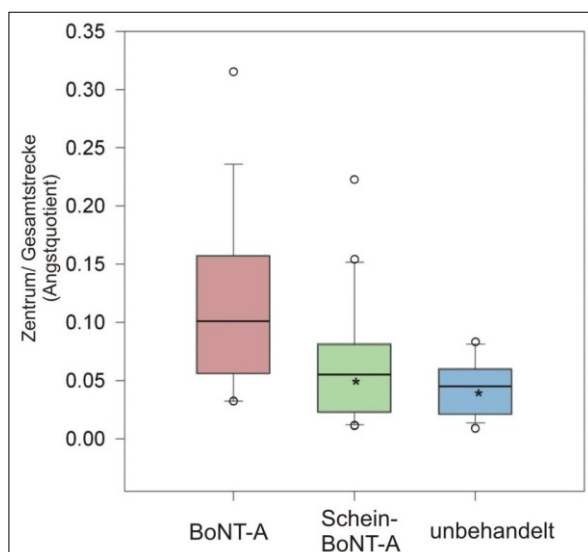


Diagramm 19.: Verteilung der Angstquotienten der verschiedenen Versuchstiergruppen

Aufgeführt sind Quotienten aus der zurückgelegten Strecke im Zentrum der Open-Field-Arena (Dividend) und der Gesamtstrecke die durch eine Ratte zurückgelegt wurde (Divisor). Je höher der Wert dieses sogenannten Angstquotienten ist, umso geringer sollte die Ängstlichkeit des jeweiligen Tieres sein. Es ist der Median der Angstquotienten einer jeweiligen Gruppe aufgeführt, sowie das obere und unter Quartil, das zehnte und neunzigste Perzentil, die hier einem Fehlerbalken ähneln und Werte, die das zehnte oder neunzigste Perzentil unter-, bzw. überschreiten (hier durch Kreise dargestellt). BoNT-A behandelte Ratten bewegen sich verhältnismäßig häufiger im Zentrum der Open-Field-Arena als scheinoperierte Ratten und

gänzlich unbehandelte Ratten. *= signifikant ($p \leq 0,5$)

Tabelle 2.: Defäkationsereignisse im Open Field

Gruppe	N	Mittlere Defäkationen	Standardabweichung	Mittlerer Standardfehler	p versus BoNT-A
BoNT-A	17	4,529	2,718	0,659	
Schein-BoNT-A	20	3,450	2,724	0,609	0,204
Kontrolle	18	2,333	2,142	0,505	0,014

3.3.3.2.2. Grooming/ Putzen

Die Häufigkeit von beobachteten Putzverhaltensweisen im Open Field wurde ebenfalls analysiert. Putzverhalten stellt im Allgemeinen ein Maß für Angstlosigkeit dar. Die verschiedenen Versuchstiergruppen zeigten im Open Field keine signifikanten Unterschiede im Putzverhalten.

3.3.3.2.3. Rearing/ Aufrichten

Es konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit des Aufrichtens der Ratten zwischen den drei Versuchsgruppen festgestellt werden. Das Aufrichten dient dem Tier zur Erkundung neuer Umgebungen.

3.3.4. Testung der Angst und des spontanen motorischen Verhaltens mittels des Elevated Plus Maze

In dem Elevated-Plus-Maze-Test konnte festgestellt werden, dass die Ratten aller drei Versuchsgruppen den Aufenthalt in den geschlossenen Armen gegenüber dem in den offenen Armen bevorzugen. Tiere, die die offenen Arme nie betreten haben, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Dies traf auf vier Tiere zu, die sich auf alle drei Versuchstiergruppen verteilten.

Bei der durchschnittlichen Gesamtzahl der Besuche von Testarmen gab es zwischen den drei Versuchstiergruppen keine signifikanten Unterschiede (**Diagramm 20A**). Auch die durchschnittlichen zurückgelegten Strecken der Tiergruppen in Versuchsapparatur unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Der Anteil der offenen Arme an der Gesamtzahl der Besuche von Armen im Plus Maze war bei BoNT-A-behandelten Raten sehr signifikant höher als der von gänzlich unbehandelten Ratten. Der Unterschied zu scheinoperierten Ratten war ebenfalls signifikant (**Diagramm 20B**). Dies deutet auf eine verminderte Ängstlichkeit der Tiere hin, die bilateral mit 1 ng BoNT-A intrastriatal behandelt wurden. In der Defäkationsrate waren zwischen den Tiergruppen keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

Ergebnisse

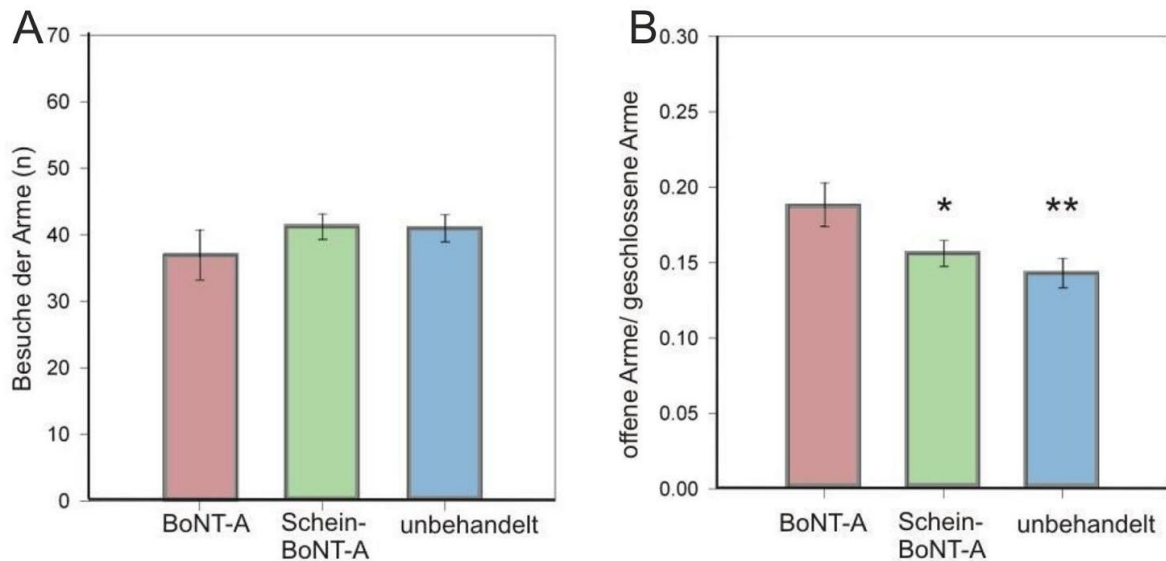


Diagramm 20.: Verhalten im Plus Maze

Diagramm A) ist zu entnehmen, dass sich die durchschnittliche Gesamtzahl der Besuche von Armen der Elevated-Plus-Maze-Apparatur zwischen den Versuchstiergruppen nicht signifikant voneinander unterschieden hat.

In B) sind für die drei Versuchstiergruppen die mittleren Quotienten aufgeführt, die sich bei der Division der Anzahl der Besuche der offenen Arme durch die Zahl der Besuche der geschlossenen Arme ergeben. Gegenüber scheinoperierten Tieren besuchten BoNT-A-behandelte Ratten signifikant häufiger offene Arme, gegenüber unbehandelten Ratten taten sie dies sogar stark signifikant häufiger.

Die Fehlerbalken geben den mittleren Standardfehler wieder.

*= signifikant ($0,01 < p \leq 0,05$); ** sehr signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$)

3.4. Kognitionstests

3.4.1. Water Maze

Wie in der Beschreibung der Methodik des Water-Maze-Testes erwähnt, gab es insgesamt fünf Trainingsblöcke innerhalb von drei Tagen für jedes zu testende Tier. Zu jedem dieser Trainingsblöcke wurde die jeweilige Ratte vier Mal im Water-Maze-Becken schwimmen gelassen. Schon während der Trainingsphase wurde digital erfasst, wie lange die Ratten benötigten um die Plattform aufzufinden. Hier haben während der ersten drei Trainingsblöcke die mit BoNT-A behandelten Ratten signifikant langsamer die Plattform gefunden als scheinbehandelte Tiere und gänzlich unbehandelte Tiere. Bei den letzten beiden Trainingsblöcken unterschieden sich die benötigten durchschnittlichen Zeiten der Tiergruppen zum Auffinden der Plattform nicht mehr signifikant voneinander (**Diagramm 21**).

Während des eigentlichen Testdurchlaufes, bei dem die Plattform aus dem Water Maze entfernt wurde, zeigten die drei Tiergruppen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Kreuzungen des Quadranten, in dem sich ehemals die Plattform befand, auch unterschieden sich die Zeiten, die dort insgesamt durchschnittlich verbracht wurden und die

Ergebnisse

Schwimmgeschwindigkeiten nicht signifikant voneinander (**Diagramme 22 – 23; Tabellen 28A- 30A**).

Durch die anfangs signifikant höhere Latenz zum Auffinden der Plattform während der Trainingsphase durch die BoNT-A-behandelten Ratten im Vergleich zu scheinbehandelten Ratten und Kontrollratten gibt es Indizien, die für eine leichte Einschränkung der räumlichen Lernfähigkeit durch bilaterale intrastriatale Gabe von BoNT-A sprechen. In späteren Trainingsphasen und in der Testphase lassen sich keine Beeinträchtigungen der BoNT-A-behandelten Tiere mehr beobachten. Jedoch ist kritisch zu bemerken, dass man aufgrund der räumlichen Gegebenheiten gezwungen war ein Becken zu benutzen, dessen Durchmesser mit 1,05 m unter den in der Literatur beschriebenen Beckendurchmessern von 1,20 – 1,80 m für Kognitionstests mit Ratten lag (First et al., 2011; Garthe et al., 2009; Morris, 1984; Rockenstein et al., 2011). Es ist denkbar, dass hierdurch der Test an Schwierigkeit eingeübt hat und eventuelle kognitive Defizite nicht mehr sensitiv genug erfassbar waren.

Die Geschwindigkeit, mit der sich die Ratten schwimmend im Water-Maze-Becken fortbewegten, unterschied sich zwischen den Versuchstiergruppen nicht signifikant voneinander.

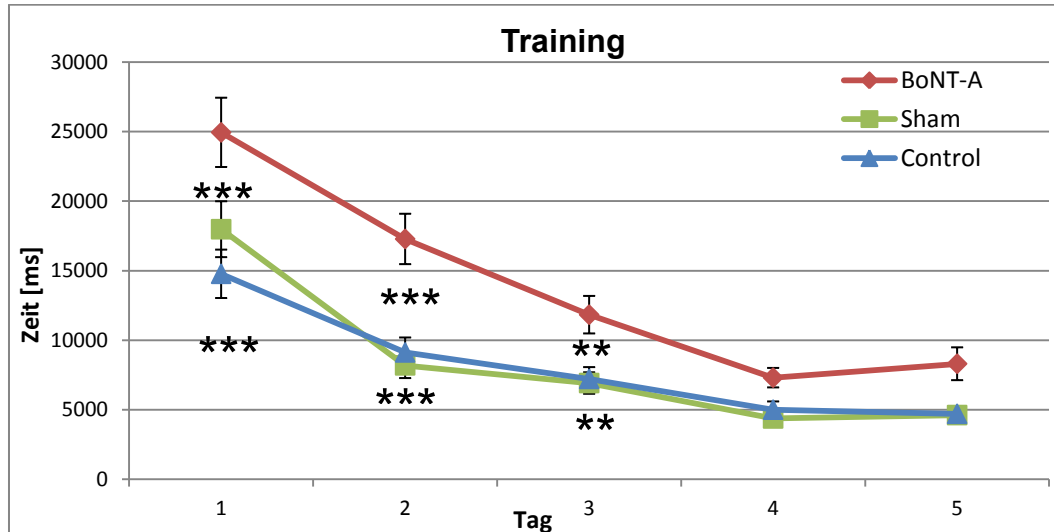


Diagramm 21.: Latenzen zum Auffinden der Plattform im Water Maze

Aufgetragen sind die durchschnittlichen Zeiten in ms die die Ratten der verschiedenen Versuchsgruppen benötigten, um an den jeweiligen Trainingstagen die Plattform in der Water-Maze-Apparatur zu finden. Es wird deutlich, dass die bilateral BoNT-A-behandelten Ratten zunächst hochsignifikant länger benötigen, um die Plattform zu erreichen, sich aber im Verlauf des Trainings die Latenzzeiten der Tiergruppen zum Erreichen der Plattform stark angenähert haben, so dass deren Unterschiede nicht mehr signifikant waren. Alle Tiergruppen haben vom Training profitiert, was sich in einem deutlich schnelleren Erreichen der Plattform äußerte. Die Fehlerbalken geben den mittleren Standardfehler an.

Die Signifikanzmarkierungen (*) beziehen sich auf einen Vergleich von BoNT-A-behandelten Tieren mit scheinoperierten Tieren und auf einen Vergleich von BoNT-A-behandelten Ratten mit gänzlich unbehandelten Ratten. **= sehr signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$); ***= hochsignifikant ($p \leq 0,001$)

Ergebnisse

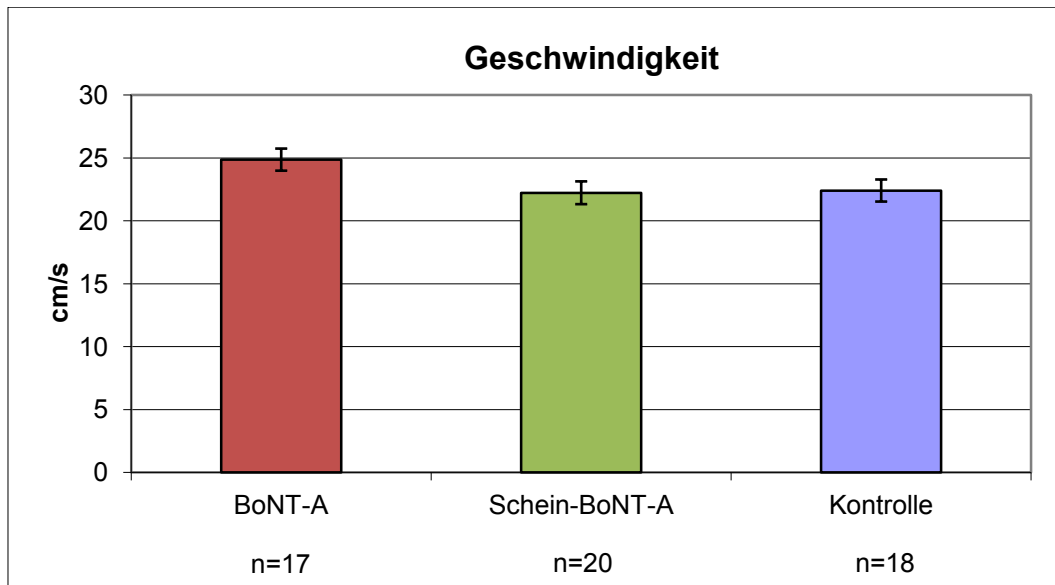


Diagramm 22.: Durchschnittliche Schwimgeschwindigkeiten der Versuchstiergruppen in der Water-Maze-Apparatur

Dargestellt sind die mittleren Geschwindigkeiten in cm/s, mit der die Ratten der drei Versuchstiergruppen im Water-Maze-Becken geschwommen sind. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gab es hierbei nicht. Der Fehlerindikator gibt den mittleren Standardfehler wieder.

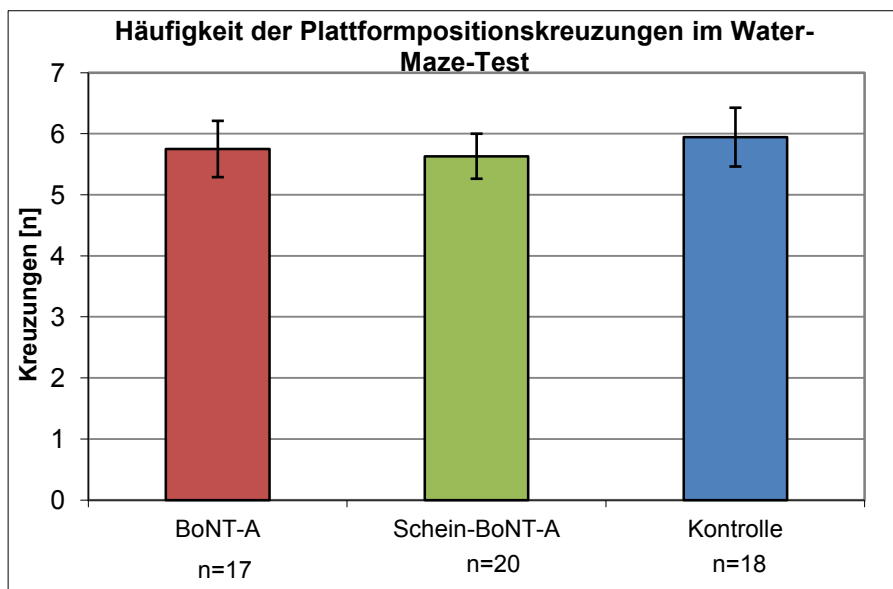


Diagramm 23.: Water-Maze-Test

Kreuzungen der Plattformposition

Während des eigentlichen Water-Maze-Testdurchlaufes wurde die Plattform aus dem Water-Maze-Becken entfernt und gemessen, wie oft die Ratten die ehemalige Position dieser kreuzen. Es ist erkennbar, dass dies die Tiere aller Gruppen nahezu gleich häufig taten. Der Fehlerindikator gibt den mittleren Standardfehler wieder.

Fehlerindikator gibt den mittleren Standardfehler wieder.

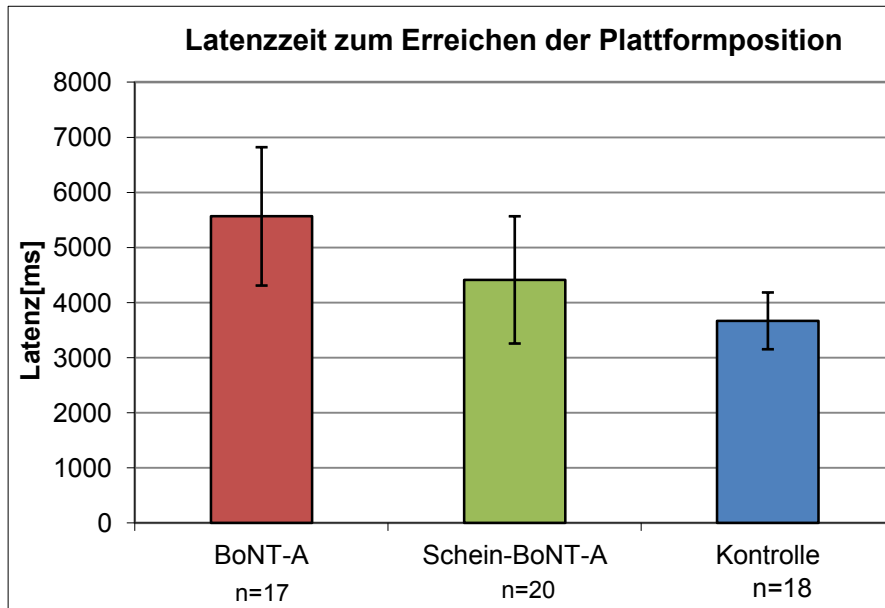


Diagramm 24.:
Latenzzeit zum erstmaligen Erreichen der Plattformposition im Water-Maze-Test

Aufgeführt sind die durchschnittlichen Latenzzeiten der Tiergruppen zwischen der Überführung in das Water-Maze-Becken und dem erstmaligen Durchschwimmen

der ehemaligen Plattformposition. Die Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen waren nicht signifikant. Der Fehlerbalken gibt den mittleren Standardfehler an.

3.4.2. Radial Maze

Im Radial-Maze bewegten sich die Tiere aller drei Gruppen mit annähernd gleicher Geschwindigkeit durch die Versuchsapparatur. Gab man die Tiere zum ersten Mal für zehn Minuten in die Apparatur, so zeigten alle Tiere ein vergleichbares Erkundungsverhalten. Es gab einen Trend dafür, dass BoNT-A behandelte Ratten etwas länger benötigten, um alle Pellets zu finden und dass sie hierfür auch eine größere Strecke zurücklegen mussten, allerdings waren entsprechende Unterschiede nicht signifikant (**Diagramm 25**).

BoNT-A-behandelte Tiere betraten im Verlauf eines Testes im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren signifikant öfter bereits besuchte Arme, aus denen sie bereits das Futter gefressen haben, was auf Einschränkungen im Arbeitsgedächtnis hinweisen könnte (**Diagramm 26**). Auch scheinbehandelte Tiere neigten dazu vermehrt bereits besuchte Arme zu betreten, allerdings weniger häufig als BoNT-A-Tiere und nicht signifikant. BoNT-A- und scheinbehandelte Tiere benötigten zum Auffinden des gesamten Futters in den Armen etwas mehr Zeit als Kontrolltiere. Diese Unterschiede waren zwischen BoNT-A behandelten Tieren und unbehandelten Kontrollratten hochsignifikant und lassen sich zum Teil durch das häufigere Aufsuchen bereits betretener Arme erklären (**Diagramm 27**). Es konnten keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden was die Häufigkeit von „falsch“ besuchten Armen in dem Experimenterteil angeht, bei dem sich die Tiere über fünf Tage hinweg einprägen sollten, in welchen vier der acht Arme Futter versteckt war und in welchen

Ergebnisse

nicht. Die Testung des Referenzgedächtnisses brachte also keine Defizite zu Tage (**Diagramm 28**).

Durch den Radial Maze Test ließ sich nicht nachweisen, dass eine beidseitige intrastriatale Gabe von BoNT-A zu einer Einschränkung der Lernfähigkeit bezüglich des Langzeitgedächtnisses von Ratten führt.

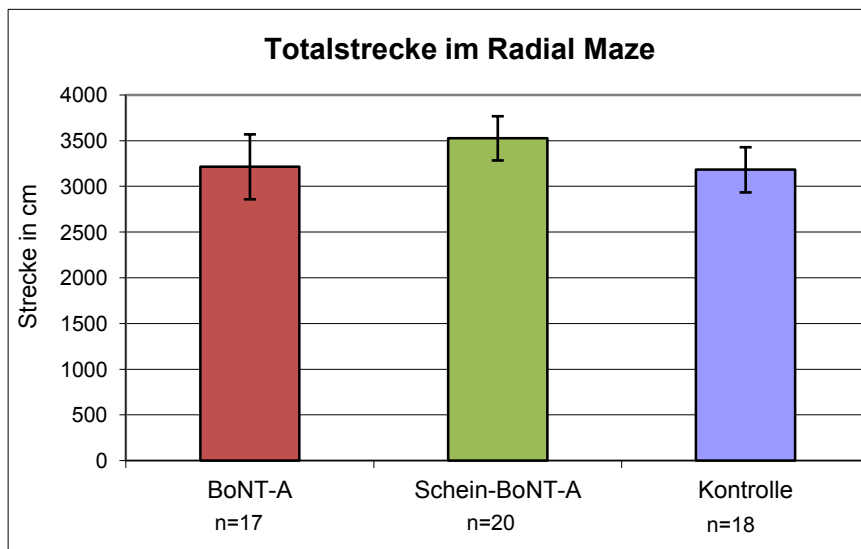


Diagramm 25.:
Durchschnittlich zurückgelegte Strecke in der Radial-Maze-Apparatur der Versuchstiergruppen, bei Beschickung aller acht Arme mit Futter

Wird den Tieren aller drei Versuchstiergruppen die Möglichkeit gegeben die Radial-Maze-Apparatur zehn Minuten lang zu erkunden,

wobei alle acht Arme mit Futter beschickt sind, so wird bei allen drei Tiergruppen ein ähnlich starkes Erkundungsverhalten an den Tag gelegt und annähernd die gleiche Strecke zurückgelegt. Die Tiere waren demnach auch von ihren motorischen Fähigkeiten her in der Lage die nachfolgenden Tests zu absolvieren. Der Fehlerindikator gibt den mittleren Standardfehler an.

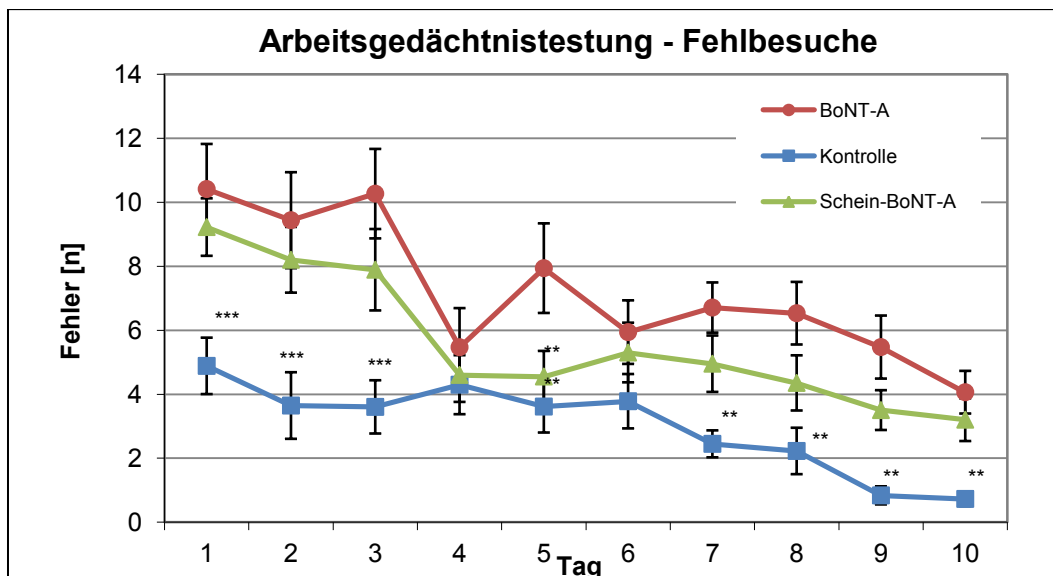


Diagramm 26.: Testung des Arbeitsgedächtnisses

Dargestellt sind die Ergebnisse der Arbeitsgedächtnistestungen im Radial Maze. Es wurde ermittelt wie oft die Tiere fälschlicher Weise Arme noch mal betreten haben, aus denen sie das Futter bereits gefressen haben. Doppelseitig BoNT-A-behandelte Ratten begehen zum Teil hochsignifikant mehr Fehler, als unbehandelte Kontrollratten. Auch die Fehlerhäufigkeit der scheinoperierten Tiere ist erhöht. Die Fehlerindikatoren geben die mittleren Standardfehler wieder. ** = sehr signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$); *** = hochsignifikant ($p \leq 0,001$)

Ergebnisse

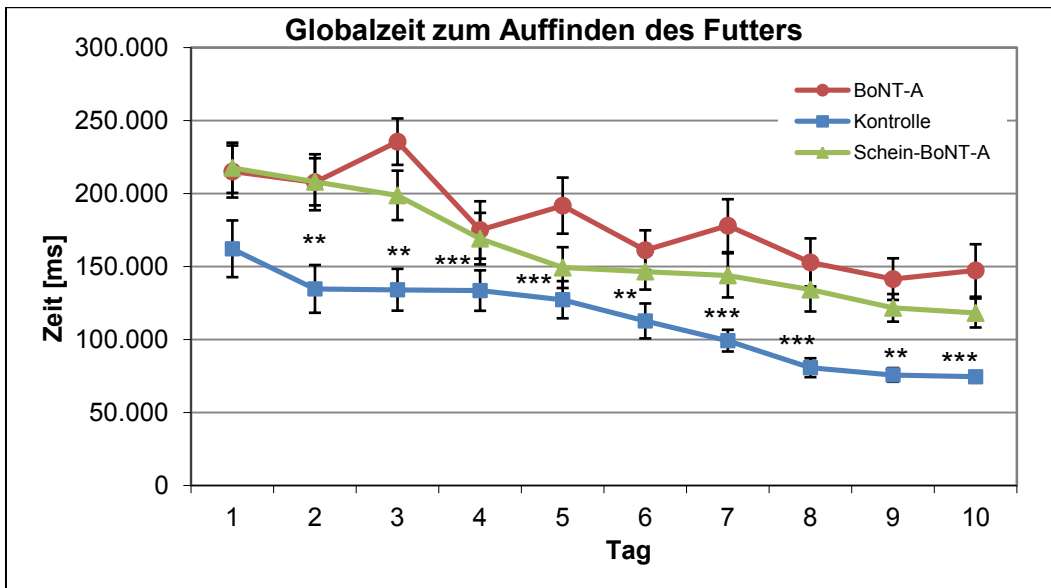


Diagramm 27.: Globalzeit zum Auffinden des gesamten Futters im Radial Maze während der einzelnen Testtage

BoNT-A-behandelte Ratten benötigen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollratten teilweise hochsignifikant mehr Zeit, bis sie das gesamte Futter aufgefunden haben. Zum Teil lässt sich dies aus der erhöhten Rate von Fehlbesuchen bereits betretener Arme erklären. Die Fehlerindikatoren geben die mittleren Standardfehler wieder. ** = sehr signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$); *** = hochsignifikant ($p \leq 0,001$)

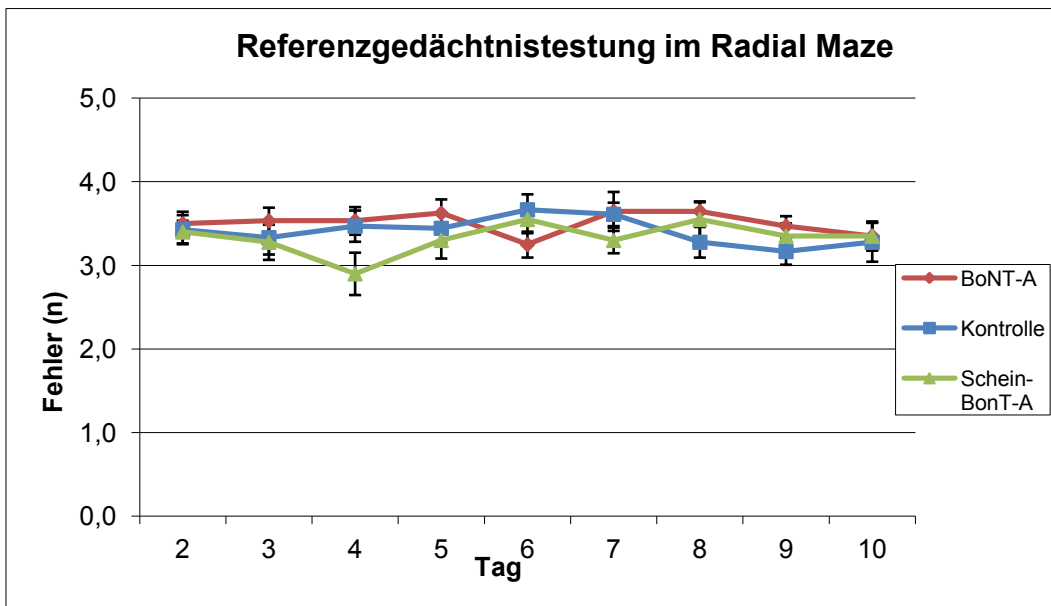


Diagramm 28.: Testung des Referenzgedächtnisses im Radial Maze

Das erste Betreten von Armen der Radial-Maze-Apparatur, die nie mit Futter befüllt waren, wurde als Fehler gewertet. Nach sechs Tagen wurden die anderen Arme mit Futter befüllt. Der erste Test nach dem Wechsel des Befüllungsmusters ging nicht in die Auswertung ein, da die Tiere erst mit diesem Wechsel vertraut gemacht werden mussten. Die Tiergruppen zeigten bei diesem Test keine signifikanten Unterschiede. Die Fehlerindikatoren geben die mittleren Standardfehler wieder.

3.5. Histologie/ Stereologie

3.5.1. Histochemie

3.5.1.1. Nissl-Färbung

Von allen aufgearbeiteten Gehirnen wurde an jedem siebten Parallelschnitt eine Nisslfärbung durchgeführt. Hier konnten in den BoNT-A-behandelten Gehirnen keine Auffälligkeiten wie z. B. eine Gliose festgestellt werden (**Abb. 13**).

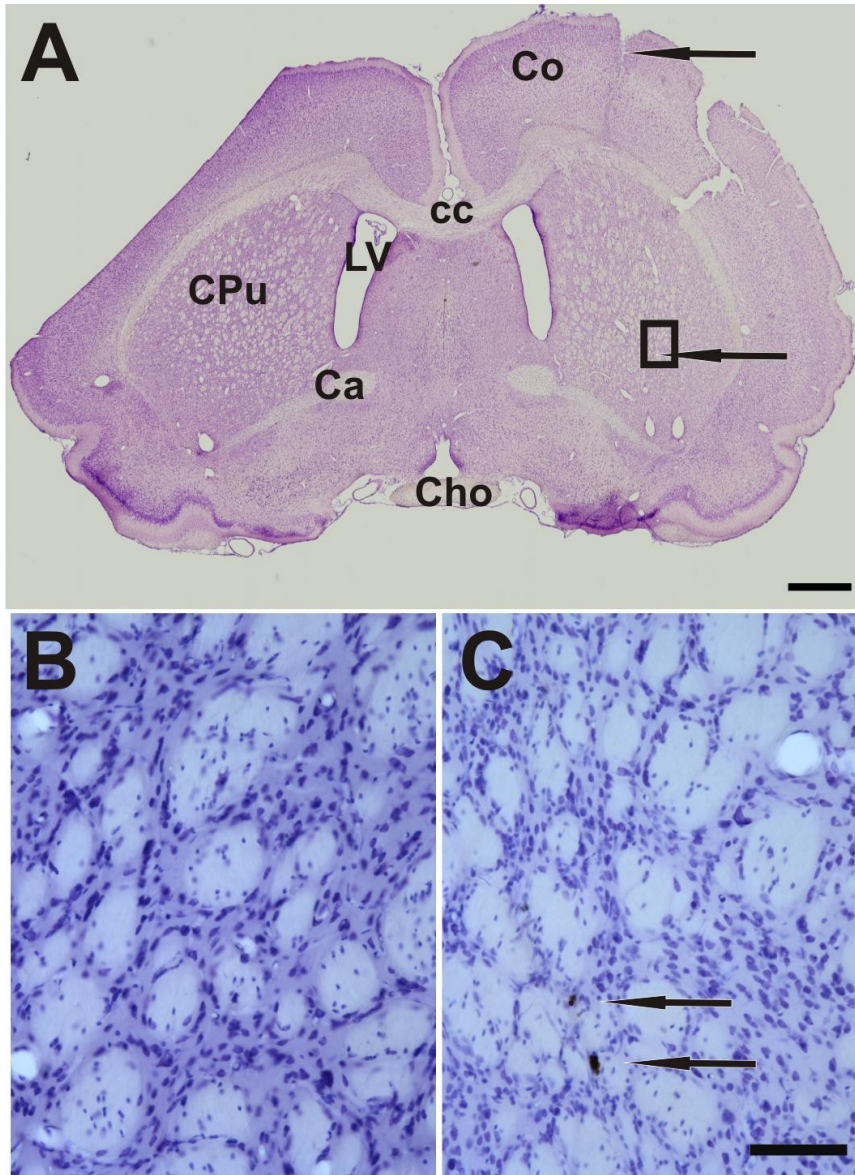


Abbildung 13.: Keine Auffälligkeiten in Nissl-gefärbten (Kresylviolett-Färbung) Rattenhirnpräparaten nach BoNT-A-Behandlung

Dargestellt sind Aufnahmen eines Nissl-gefärbten 30 µm dicken Frontalschnittes, der von einem Rattenhirn stammt, dessen rechtes CPu mit 1 ng BoNT-A infundiert wurde. Drei Monate später fand die Perfusion statt. (A) Übersichtsaufnahme des entsprechenden histologischen Präparats. Die Pfeile markieren die Injektionsstelle, das Rechteck den Ausschnitt, der in (C) in höherer Vergrößerung zu sehen ist. Makroskopisch lassen sich in dem Präparat keine Seitenunterschiede in der Kresylviolett-Färbung erkennen. An der linken Hemisphäre wurde vor Beginn der Anfertigung histologischer Schnitte am Kryostaten, auf der gesamten Länge der rostrokaudalen Achse des Telencephalons ein Teil des Kortex entfernt,

um später eine eindeutige Links-Rechts-Zuordnung durchführen zu können. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. (B) und (C) mikroskopische Aufnahmen von Ausschnitten des linken (B) und rechten (C) CPu's. Auch bei mikroskopischer Begutachtung von BoNT-A-behandelten Striata lassen sich in der Nissl-Färbung keine Auffälligkeiten wie Zelluntergang oder vermehrte Gliose und keine Unterschiede zu unbehandelten Striata feststellen. Die Pfeile deuten auf durch Kalziumsalzeinlagerung bräunlich gefärbte Makrophagen im Injektionskanal. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Ca: Commissura anterior; CC: Corpus callosum; Cho: Chiasma opticum; Co: Kortex; CPu: Caudatus-Putamen-Komplex/ Striatum; LV: Lateralventrikel

3.5.1.2. AChE-Färbung

In der AChE-Färbung die das Acetylcholinesterasevorkommen in Geweben widerspiegelt, konnte in Gehirnschnitten von Tieren die mit 100 pg, 1 ng und 2 ng BoNT-A intrastriatal behandelt wurden, keine Auffälligkeiten beobachtet werden. Lediglich in direkter Nachbarschaft des Injektionskanals erschien die Anfärbung ein wenig schwächer (Abb. 14). Dies deutet auf einen verminderten Gehalt an Acetylcholinesterase in diesem durch das BoNT-A und das Trauma des Injektionsprozesses beeinflusste Areal hin.

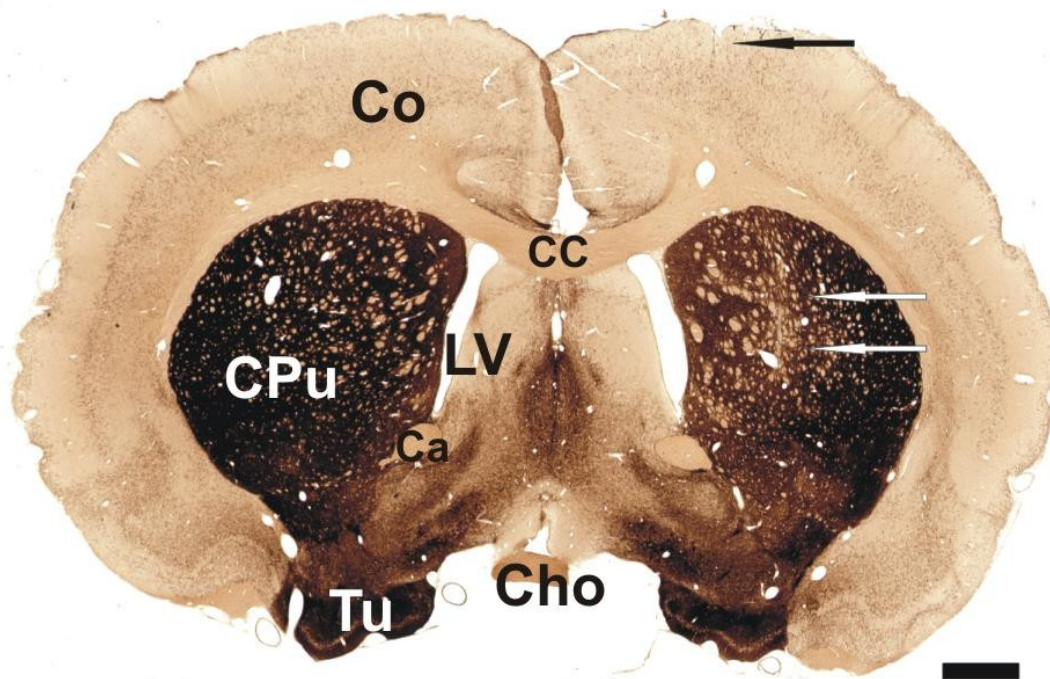


Abbildung 14.: AChE-Färbung an einem 30 µm dicken Frontalschnitt eines Rattengehirns, dessen rechtes CPu mit 2 ng BoNT-A infundiert wurde

Die Abbildung zeigt das mittels eines Hochleistungsscanners aufgenommene Bild eines AChE-gefärbten Präparats eines Rattengehirns, dem 2 ng BoNT-A in das rechte CPu injiziert wurden und das einen Monat nach der Operation entnommen wurde. Die Pfeile markieren die Injektionsstelle. Eine leicht verminderte Acetylcholinesteraseaktivität lässt sich aufgrund verringerter Anfärbung um die Injektionsstelle herum im rechten CPu erkennen.

Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

Ca: Commissura anterior; CC: Corpus callosum; Cho: Chiasma opticum; Co: Kortex; CPu: Caudatus-Putamen-Komplex/ Striatum; LV: Lateralventrikel; Tu: Tuberculum olfactorium

3.5.2. Immunhistochemie

3.5.2.1. Immunhistochemische Färbungen gegen ChAT

Im Zuge der Analyse der immunhistochemischen Anfärbung acetylcholinergere Strukturen in Parallelschnitten der Gehirne intrastriatal BoNT-A-behandelter Ratten konnte eine Veränderung der Anzahl und Morphologie der cholinergen Interneurone des Striatums nicht festgestellt werden.

Im Striatum der BoNT-A-behandelten Hemisphäre fielen lichtmikroskopisch an cholinacetyltransferasepositiven Fasern sphärische Aufweitungen auf, die eine variable Größe im Mikrometerbereich hatten (**Abb. 15**). Besonders hoch war die Konzentration dieser Strukturen im Bereich um die Injektionsstellen. Zahl, Größe und Radius des Vorkommens um die Injektionsstellen herum war bei einer höheren Dosis (2 ng, 1 ng) deutlich größer als bei einer geringeren Dosierung (100 pg). Solche Strukturen waren in der kontralateralen Hemisphäre nicht zu beobachten, ebenso wenig wie in den Striata gleichartig angefarbter Gehirne von schein-BoNT-A-behandelten oder gänzlich unbehandelten Ratten. Ähnliche Erscheinungen wurden in der Literatur im Zusammenhang mit Botulinumtoxin, auch in der peripheren Anwendung, noch nicht beschrieben. Diese Strukturen wurden als ChAT-positive Botulinumtoxininduzierte Varikositäten (BiVs) bezeichnet.

Bei einer weiteren Analyse der gegen ChAT angefarbten Präparate konnten auch BiVs im piriformen Kortex sowie im Tuberculum olfactorium aufgefunden werden.

ChAT-positive BiVs wurden auch in Präparaten aufgefunden, die von Tieren stammen, denen vier Wochen vor BoNT-A-Injektion in das Striatum dieses mittels Injektion von 6-OHDA in das MVB dopaminerg deafferentiert wurde.

Diese ChAT-positiven BiVs konnten an Gehirnen nachgewiesen werden, deren BoNT-A-Injektion bis zu der Perfusion zwei Wochen zurück lag, als auch an Gehirnen, bei denen die entsprechende Operation ein Monat, zwei Monate, drei Monate, sechs Monate, neun Monate und sogar zwölf Monate zurück lag. Die Häufigkeit des Vorkommens dieser BiVs schien mit zunehmendem zeitlichem Abstand von BoNT-A-Injektion und Perfusion abzunehmen, allerdings schien sich das Volumen der einzelnen BiVs zu erhöhen.

Ergebnisse

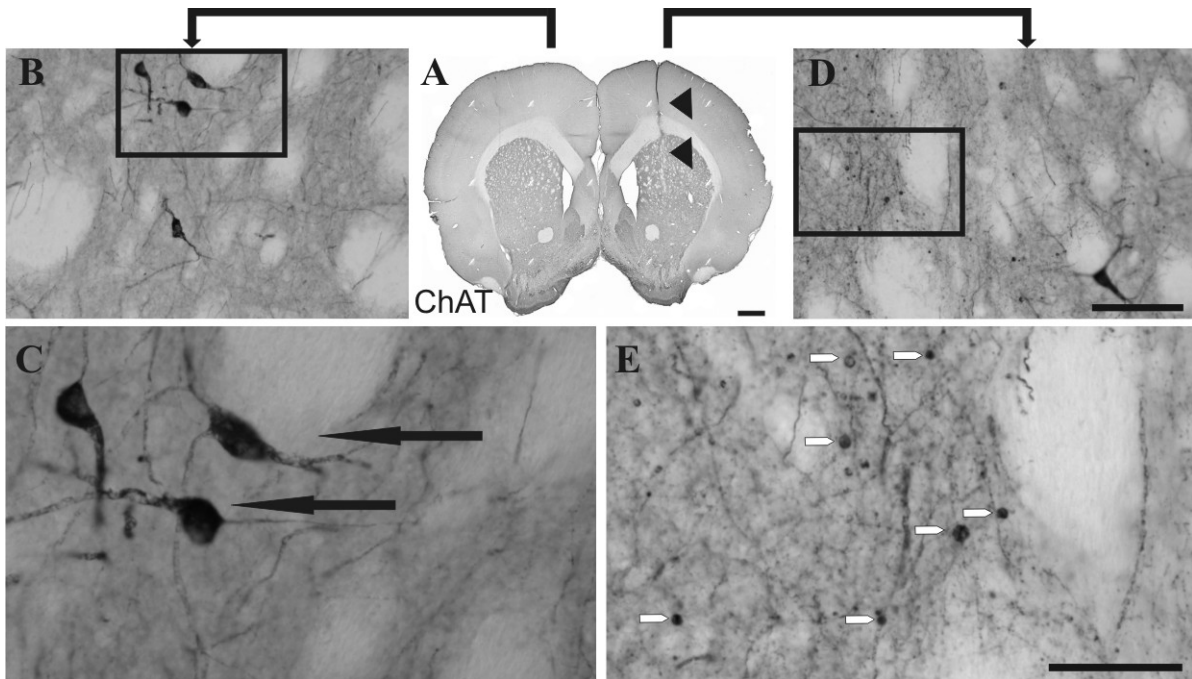


Abbildung 15.: Immunhistochemische Färbung gegen ChAT an einem histologischen Schnitt eines unilateral BoNT-A-behandelten Rattengehirns

In (A) ist eine Übersicht des gesamten Frontalschnittes zu sehen. Die schwarzen Pfeilspitzen deuten auf die Injektionsstelle.

(B) und (C) sind mikroskopische Bilder des linken (unbehandelten) Striatums. (C) entspricht dem in (B) mit einem Rechteck markierten Ausschnitt. Hier sind cholinerge Nervenzellen zu erkennen, die in (C) mit schwarzen Pfeilen markiert wurden. Auffälligkeiten sind hier nicht zu beobachten.

In (D) und (E) sind mikroskopische Aufnahmen des rechten (BoNT-A-behandelten) CPu zu sehen, wobei (E) dem vergrößerten Ausschnitt aus (D) entspricht, der hier ebenfalls mit einem Rechteck markiert worden ist. In (D) ist am rechten unteren Bildrand auch ein cholinerges Neuron zu erkennen. Sowohl in (D) als auch in (E) erkennt man deutlich ChAT-positive Auftreibungen an cholinergen Fasern, die als BiVs bezeichnet wurden. In (E) deuten weiße Pfeile auf die BiVs.

Der Maßstabsbalken in (D) entspricht 100 µm und ist auch für (B) gültig. Der Maßstabsbalken in (E) entspricht 50 µm und ist ebenfalls für (C) gültig.

3.5.2.2. Immunhistochemische Färbung gegen TH

Interessanter Weise konnten die oben beschriebenen Aufweitungen an Nervenfasern bei Tieren, die intrastriatal mit BoNT-A behandelt wurden, nicht nur in der Anti-ChAT-Färbung nachgewiesen werden, sondern sie wurden ebenfalls in Gehirnschnitten aufgefunden, die gegen TH angefärbt wurden. Diese TH-positiven Varikositäten erschienen im Vergleich zu ChAT-positiven BiVs von anti-ChAT-gefärbten Parallelschnitten derselben Gehirne sogar ein wenig größer. Prinzipiell variierte die Größe aller BiVs zwischen 2 und 15 µm.

An Gehirnschnitten, die immunhistochemisch gegen TH angefärbt wurden und die von Tieren stammen, bei denen vor BoNT-A-Applikation ipsilateral durch 6-OHDA-Läsion die dopaminergen Neurone der SN zerstört worden sind, konnten solche TH-positiven Varikositäten nicht aufgefunden werden. Dies spricht dafür, dass die TH-positiven BiVs

Strukturen sein müssen, die auf eine Alteration der Morphologie der Axone der SN-ständigen dopaminergen Neurone sein müssen.

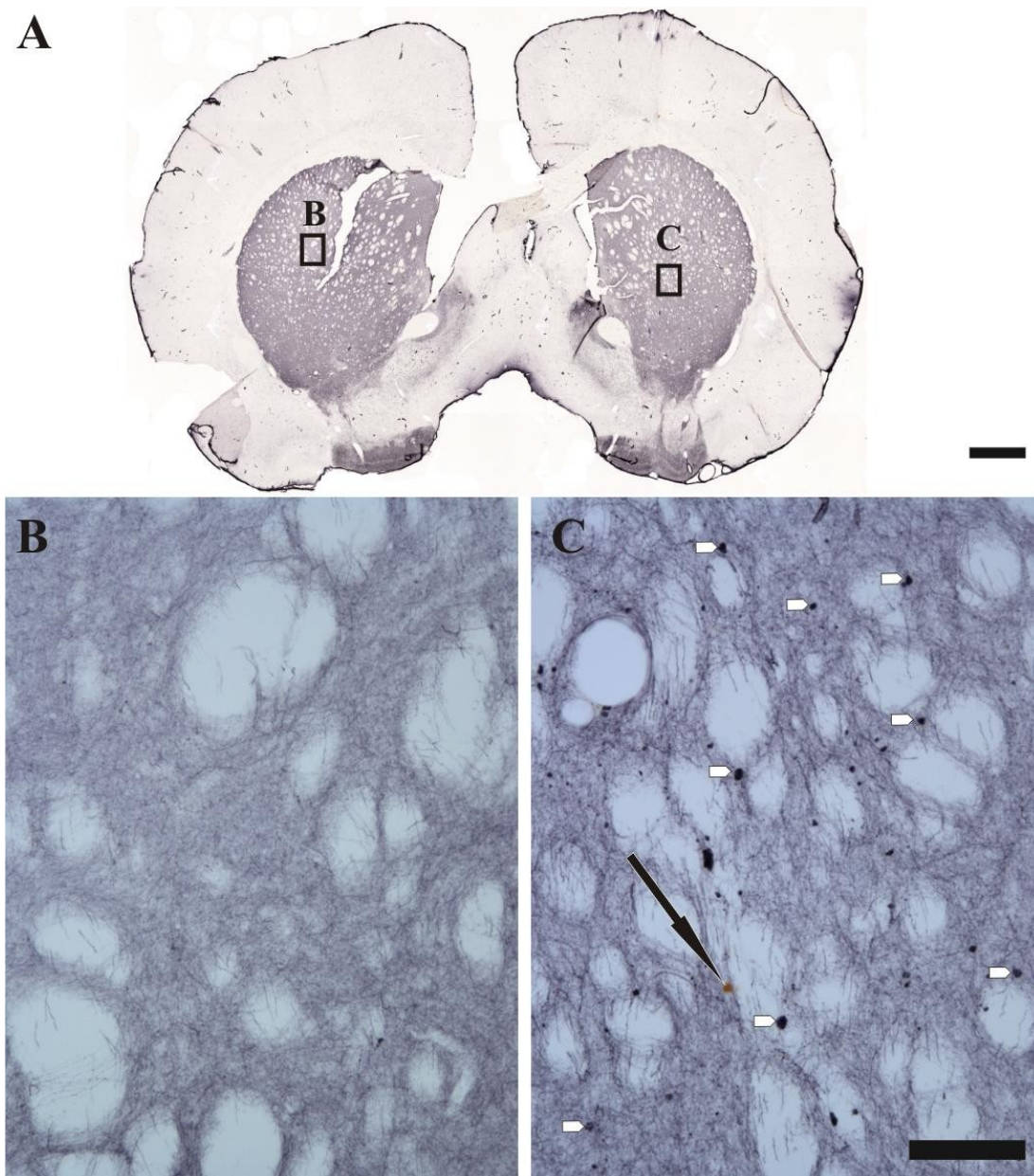


Abbildung 16.: Immunhistochemische Färbung gegen TH an einem histologischen Schnitt eines unilateral BoNT-A-behandelten Rattengehirns

In Teilabbildung A) ist ein gegen TH angefärbter Frontalschnitt eines Telencephalons einer Ratte zu sehen, in dessen rechtes Striatum 1 ng BoNT-A injiziert wurden. Markiert sind hier die Positionen, in denen Teilabbildungen B) und C) aufgenommen wurden.

Teilabbildung B) stammt aus dem linken, unbehandelten Striatum, hier sind keine Auffälligkeiten an den TH-positiven Fasern zu erkennen.

Teilabbildung C) wurde im rechten, mit 1 ng BoNT-A-behandelten Striatum aufgenommen. Ein Teil des Injektionskanals wurde mit dieser Aufnahme erfasst. Zu erkennen ist dies an dem mit einem schwarzen Pfeil markierten gelb-bräunlichen Makrophagen. Gleichzeitig sind eine Reihe TH-positiver BiVs zu erkennen, die mit weißen Pfeilspitzen markierten wurden.

Der Maßstabsbalken in A) entspricht 1 mm und der Maßstabsbalken für B) und C) entspricht 100 μ m.

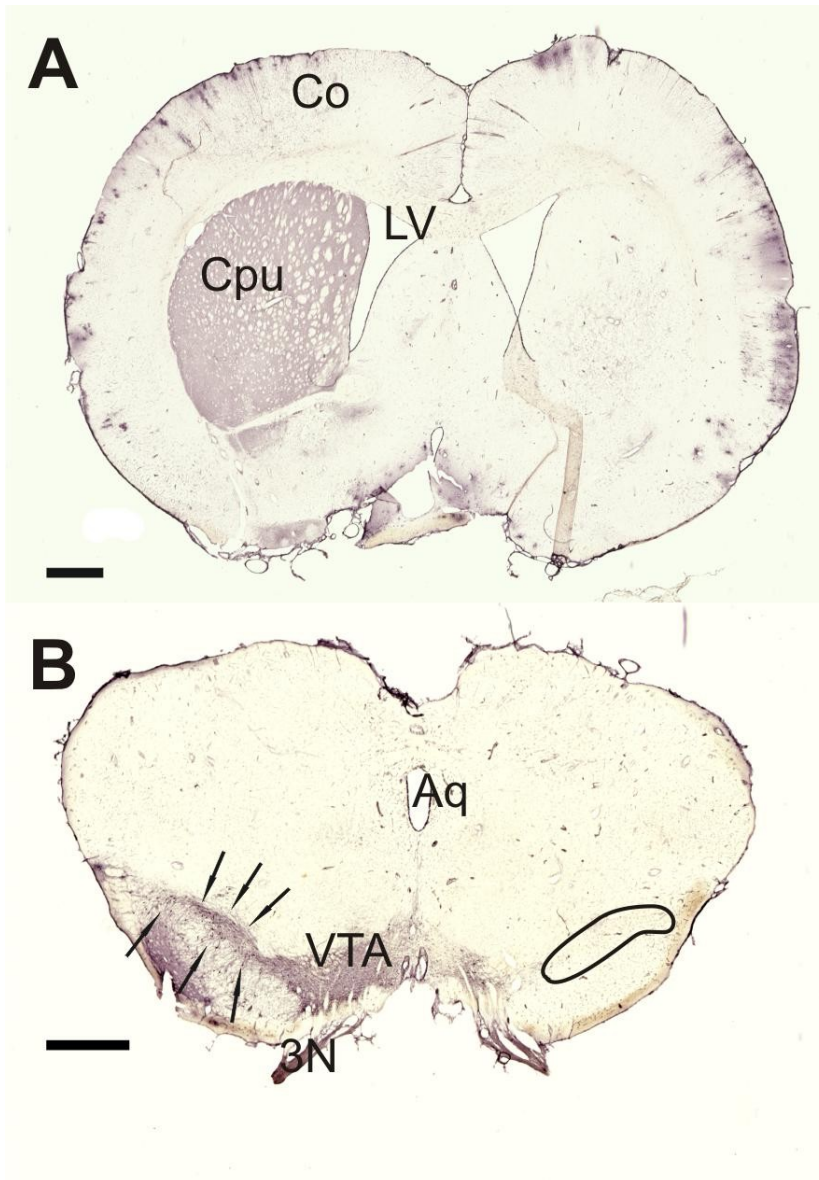


Abbildung 17.:

Immunhistochemische Färbung gegen TH an histologischen Frontalschnitten eines 6-OHDA-hemiläsionierten Rattengehirns

Abgebildet sind TH angefärbte histologische Schnitte eines Gehirns einer Wistar-Ratte, deren rechte SN mittels einer 6-OHDA-Injektion in das rechte mediale Vorderhirnbündel läsioniert worden ist.

In **A)** ist ein Präparat aus dem Telencephalon mitsamt CPU abgebildet. Deutlich ist zu erkennen, dass es auf läsionierter Seite im Striatum zu einem Verlust sämtlicher katecholaminerger Afferenzen gekommen ist, worauf eine spezifische Anfärbung des Striatums ausbleibt.

B) zeigt einen Frontalschnitt durch das Mittelhirn eines mit 6-OHDA hemiläsionierten Tieres. Auf der intakten (linken) Seite ist mit Pfeilen die deutlich angefärbte SNpc markiert. Zur Mitte hin grenzt das ebenfalls katecholaminerge Ventrale Tegmentale Areal an. Auf der kontralateralen Seite ist die Position der SNpc markiert. Hier

kam es zu einem massiven Verlust der dopaminergen Neurone. Auch das VTA war betroffen.

Die Maßstabsbalken entsprechen in beiden Teilabbildungen 1 mm

3N: Dritter Hirnnerv/ Nervus oculomotorius; Aq: Aquaeductus mesencephali; Co: Kortex; CPU: Caudatus-Putamen-Komplex/ Striatum; LV: Lateralventrikel; VTA: Ventrales Tegmentales Areal

3.5.2.3. Doppelfluoreszenzfärbung gegen TH und ChAT

Um in letzter Konsequenz nachweisen zu können, dass die TH-Immunreaktivität und die ChAT-Immunreaktivität der BiVs nicht kolokalisiert ist, die BiVs also nicht von ein und demselben Neuronentyp abstammen, wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen TH und ChAT durchgeführt. Im Zuge dieser Färbung konnte nachgewiesen werden, dass TH-Immunreaktivität und ChAT-Immunreaktivität nicht kolokalisiert ist und dass es sich folglich um getrennte Strukturen handelt. Deutlich ist in **Abbildung 18**, dass die mit einem Cy2-Sekundärantikörper markierten, also grün fluoreszierenden TH-positiven BiVs und die mit

Ergebnisse

einem Cy3-konjugierten, also rot fluoreszierenden BiVs zwei verschiedene Strukturen darstellen, da die beiden Fluoreszenzen nicht kolokalisiert sind.

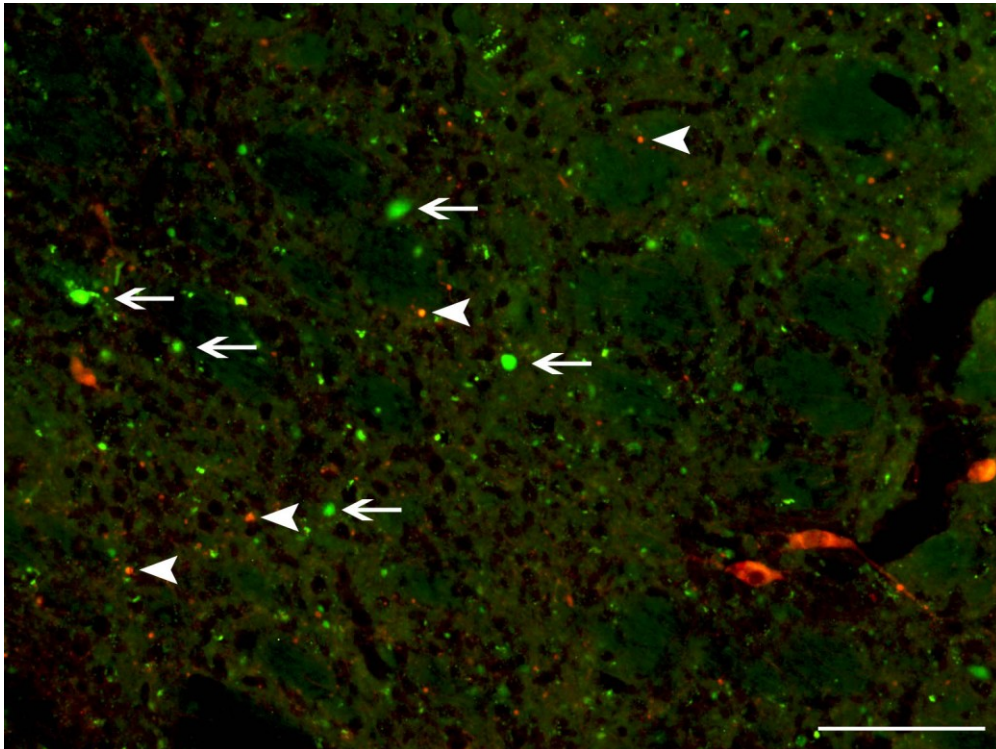


Abbildung 18.: Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen TH und ChAT

Abgebildet ist ein gegen TH (grün) und ChAT (rot) angefärbtes Präparat eines mit 2 ng BoNT-A behandelten Striatums, das mit fluoreszentkonjugierten Zweitantikörpern gefärbt wurde. Deutlich sind die rot markierten großen cholinergen Interneurone des Striatums im rechten unteren Bildabschnitt zu erkennen. Mit weißen Pfeilspitzen sind ChAT-positive BiVs markiert und mit weißen Pfeilen die TH-positiven BiVs. Niemals waren BiVs doppelmarkiert. Es fällt auf, dass TH-positive BiVs größer sind als ChAT-positive BiVs. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

3.5.2.4. Immunhistochemische Färbung gegen NeuN

Für eine erste Begutachtung eines möglichen Nervenzelluntergangs nach BoNT-A-Injektion wurde immunhistochemisch gegen neuronales nukleäres Protein (NeuN) angefärbt. Hier konnten keine Unterschiede in der Neuronendichte zwischen dem BoNT-A-behandelten und dem kontralateralen unbehandelten Striatum, sowie zu Striata gänzlich unbehandelter Tiere festgestellt werden.

3.5.2.5. Iba1- und GFAP- Färbung /Anfärbung gegen Mikroglia und Astrozyten

Um Hinweise auf einen eventuellen entzündlichen Prozess im Gehirn nach intrazerebraler BoNT-A-Injektion bekommen zu können, wurden Hirnschnittserien von exemplarisch ausgewählten BoNT-A-behandelten Tieren mit unterschiedlichen Überlebenszeiten gegen Astroglia (GFAP) und Mikroglia (Iba1) immunhistochemisch angefärbt.

Ergebnisse

Bei Tieren, bei denen die BoNT-A-Injektion zwei Wochen oder einen Monat zurück lag, konnte man eine leicht vermehrte Immunreaktivität in direkter Nachbarschaft des Injektionskanals feststellen (**Abb. 19**). Lag die BoNT-A-Applikation drei Monate und länger zurück, so konnte man in den Gehirnen keine vermehrte Immunreaktivität gegenüber GFAP oder Iba1 feststellen.

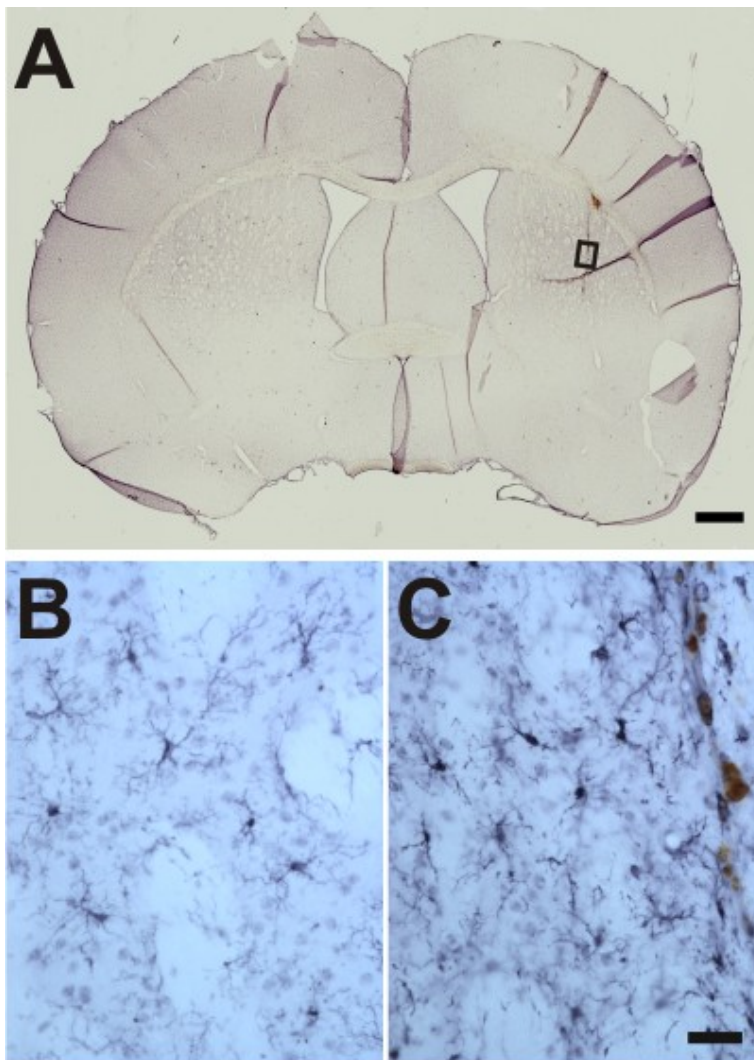


Abbildung 19.: Immunhistochemische Anfärbung gegen Iba1 (Mikroglia)

Abgebildet ist ein 30 μm dicker Frontalschnitt eines Rattengehirns, dessen rechtes CPU mit 1 ng BoNT-A behandelt wurde. Einen Monat nach BoNT-A-Injektion, wurde das entsprechende Tier getötet und das Gehirn entnommen und fixiert.

Teilabbildung **A**) zeigt eine Übersicht des entsprechenden Präparats. Im rechten Striatum ist der Injektionskanal aufgrund der bräunlich gefärbten Makrophagen zu erkennen. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. Das Rechteck markiert den Ausschnitt, der in Teilabbildung **C**) dargestellt ist.

Teilabbildung **B**) und **C**) wurden in der selben Vergrößerung aufgenommen. **B**) ist ein Ausschnitt aus dem linken, unbehandelten Striatum, **C**) ein Ausschnitt aus dem rechten, BoNT-A-behandelten Striatum im Bereich des Injektionskanals. Sowohl in **B**) und **C**) wurden Mikroglia angefärbt, jedoch war die Immunreaktivität in **C**), nahe dem Injektionskanal höher. Der Maßstabsbalken in **C**) entspricht 100 μm .

3.5.2.6. GAD-67-Färbung/ Immunhistochemische Färbung gegen GABAerge Strukturen

In der immunhistochemischen Anfärbungen gegen GABAerge Strukturen ließen sich an Präparaten des Striatums von exemplarisch ausgewählten Tieren denen 100 pg, 1 ng und 2 ng BoNT-A intrastriatal injiziert wurde, mikroskopisch keine Auffälligkeiten beobachten.

3.5.2.7. Immunhistochemische Färbungen gegen Zytoskelettproteine

In den Anfärbungen gegen β -Tubulin, β -III-Tubulin und Neurofilament ließen sich keine BoNT-A-induzierten Veränderungen nachweisen. Die Immunreaktivität für Neurofilament schien in der direkten Nachbarschaft des Injektionskanals stärker ausgeprägt zu sein als im restlichen Hirnparenchym.

3.5.2.8. Axonale Wachstumskegel

In Präparaten, die gegen axonale Wachstumskegel immunhistochemisch angefärbt wurden, erschien die Anfärbung in der Umgebung des Injektionskanals etwas intensiver.

3.5.2.9. Immunhistochemische Färbungen gegen präsynaptische Proteine

In den immunhistochemischen Anfärbungen gegen die meisten präsynaptischen Proteine (Bassoon, SNAP-25, Synapsin-1, Synaptophysin, Syntaxin, α -Synuclein, VACHT, VMAT-2, ZnT3) ließen sich keine BoNT-A-induzierten Veränderungen nachweisen.

Jedoch konnte man bei der Anfärbung gegen Synaptotagmin 1 in direkter Nachbarschaft des Injektionskanals einige große immunreaktive Varikositäten erkennen. Diese erreichten eine Größe von bis zu 10 μ m. Sie waren aber in Zahl und Abstand von Injektionsstelle weit weniger häufig vorhanden als die TH- und ChAT-positiven BiVs. Interessanter Weise ließen sich diese Strukturen hauptsächlich im Corpus callosum auffinden (**Abb. 20**).

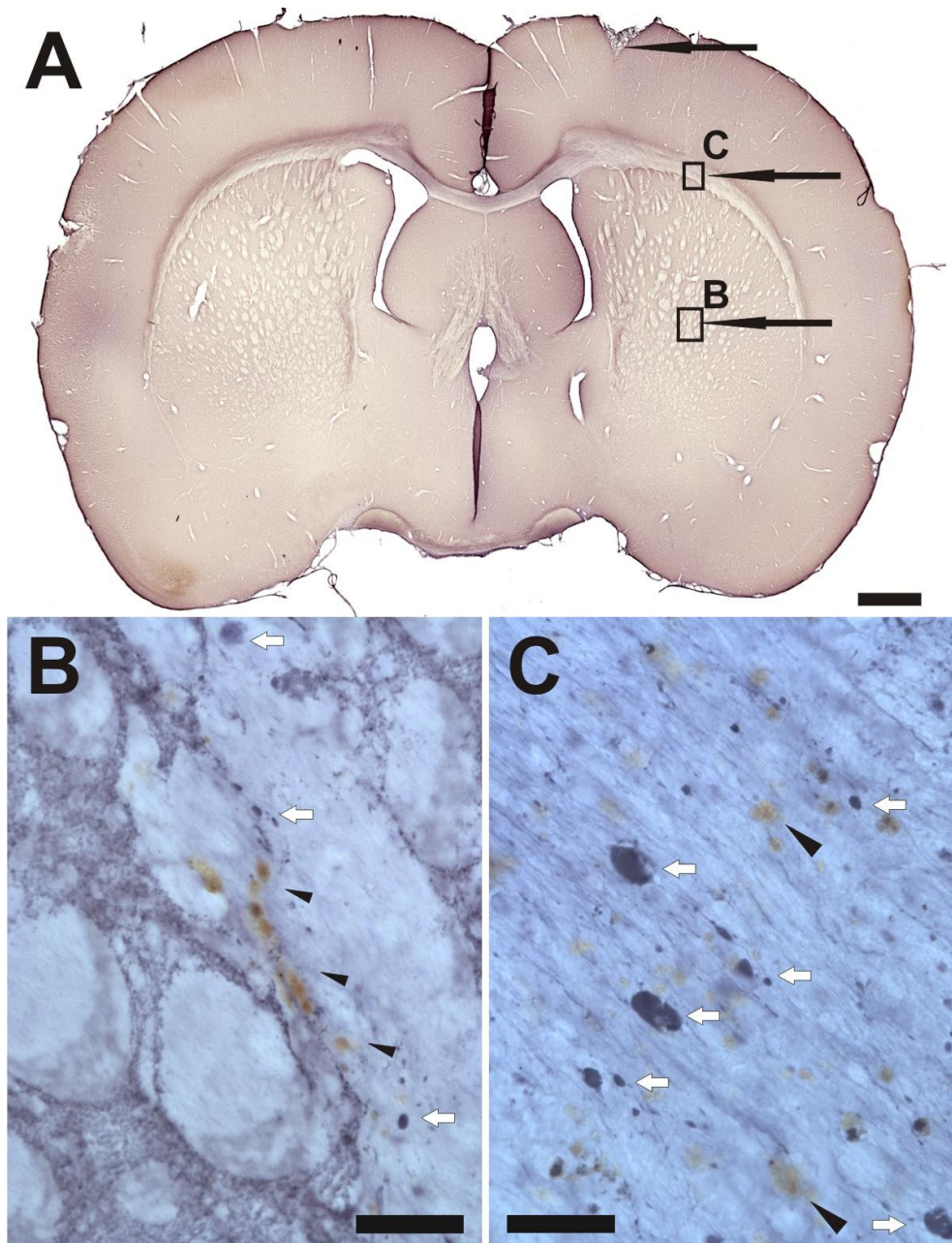


Abbildung 20.: Immunhistochemische Anfärbung gegen Synaptotagmin 1

In **A**) ist die Übersicht des angefärbten Frontalschnittes eines Rattengehirns zu sehen, in dessen rechtes Striatum ein Monat vor der Perfusion 1n g BoNT-A injiziert wurde. Die schwarzen Pfeile markieren die Injektionsstelle. Mit schwarzen Rechtecken und den entsprechenden Buchstaben sind die Ausschnitte markiert, die in den Teilabbildungen **B**) und **C**) zu sehen sind. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

In Teilabbildung **B**) ist ein Ausschnitt aus dem rechten CPu mitsamt Injektionsstelle zu erkennen. Einige immunreaktive Auftreibungen, die sich nur in der direkten Nachbarschaft des Injektionskanals befinden, sind mit weißen Pfeilen markiert. Mit schwarzen Pfeilspitzen sind Makrophagen im Injektionskanal markiert, die durch Kalziumsalzeinlagerungen eine goldbraune Färbung angenommen haben. Der Maßstabsbalken entspricht hier 50 μm .

In Teilabbildung **C**) ist ein Ausschnitt aus dem rechten Balken mitsamt Injektionskanal abgebildet. Synaptotagminpositive Auftreibungen scheinen hier häufiger vorzukommen als im CPu. Auch hier sind diese wieder mit weißen Pfeilen markiert, wohingegen Makrophagen mit schwarzen Pfeilspitzen markiert sind. Der Maßstabsbalken entspricht 75 μm .

3.5.3. Digitale Analyse der Verteilung von TH-positiven und ChAT-positiven Varikositäten

Tiere, die 2 ng BoNT-A erhielten, wiesen im Schnitt 11836 ChAT-positive Varikositäten je mm^3 bei einer mittleren Standardabweichung von 2404 auf, diese hatten im Mittel im (mikroskopischen) Bild eine Fläche von $6,34 \mu\text{m}^2 \pm 0,34$. Ein Tier, das 100 pg BoNT-A erhielt, wies durchschnittlich 7989 ChAT-positive Varikositäten je mm^3 bei einer mittleren Standardabweichung von 1488 auf, diese hatten im Mittel eine Fläche $6,73 \mu\text{m}^2 \pm 0,29$.

Die durchschnittliche Dichte an TH-positiven BiVs im Striatum eines mit 2 ng BoNT-A behandelten Tieres betrug $15188 \text{ n/mm}^3 \pm 3157$, die durchschnittliche Fläche einer solchen Varikosität betrug $6,95 \mu\text{m}^2 \pm 1,02$. Bei einem Tier, dem nur 100 pg BoNT-A appliziert wurden, fanden sich auf einen mm^3 durchschnittlich 4607 TH-positive BiVs bei einer mittleren Standardabweichung von 1409. Die durchschnittliche Fläche eines BiVs betrug hier $8,82 \mu\text{m}^2$ bei einer mittleren Standardabweichung von 0,72 (**Abb. 21**).

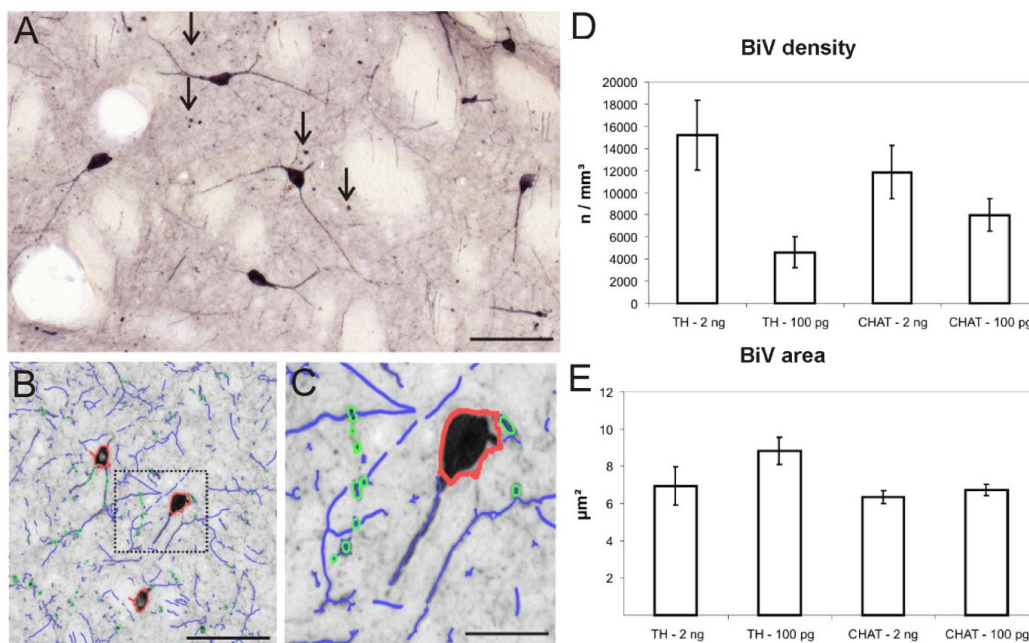


Abbildung 21.: Computerisierte Analyse der Anzahl von ChAT-positiven Zellen und Varikositäten in digitalen Bildern von immunhistochemisch gefärbten Gehirnschnitten

A) Ausschnitt aus einem gegen ChAT angefärbten $30 \mu\text{m}$ dicken Schnitt eines rechten Striatums, in das 2 ng BoNT-A injiziert wurden. Deutlich sind die cholinergen Interneurone zu erkennen. Mit Pfeilen sind die ChAT-positiven BiVs markiert. B) und C) Automatische Erkennung und Markierung von Nervenzellkörpern (rot) und Nervenfasern (blau). Die Maßstabsbalken entsprechen in A) $30 \mu\text{m}$, in B) $20 \mu\text{m}$ und in C) $10 \mu\text{m}$. D) Quantitative Analyse der BiVs. Dies geschah zum Einen in einem Gehirn, das mit 100 pg BoNT-A behandelt wurde und zum Anderen mit einem Gehirn in das 2 ng BoNT-A in das rechte Striatum injiziert wurden. Die Dichte (n/mm^3) der Varikositäten im Striatum wurde sowohl in Hirnschnitten gemessen, die gegen TH als auch in Präparaten, die gegen ChAT angefärbt worden sind. Deutlich ist eine Konzentrationsabhängigkeit sowohl für TH- als auch ChAT-positive BiVs zu erkennen. Der Student's T-Test ergab, dass diese Abhängigkeit signifikant ist ($p \leq 0,05$). E) Die BoNT-A-Dosis hat keinen signifikanten Einfluss auf die mittlere projizierte Fläche der BiVs in Schnitten von BoNT-A behandelten Striata. Der Fehlerbalken gibt immer die Standardabweichung an.

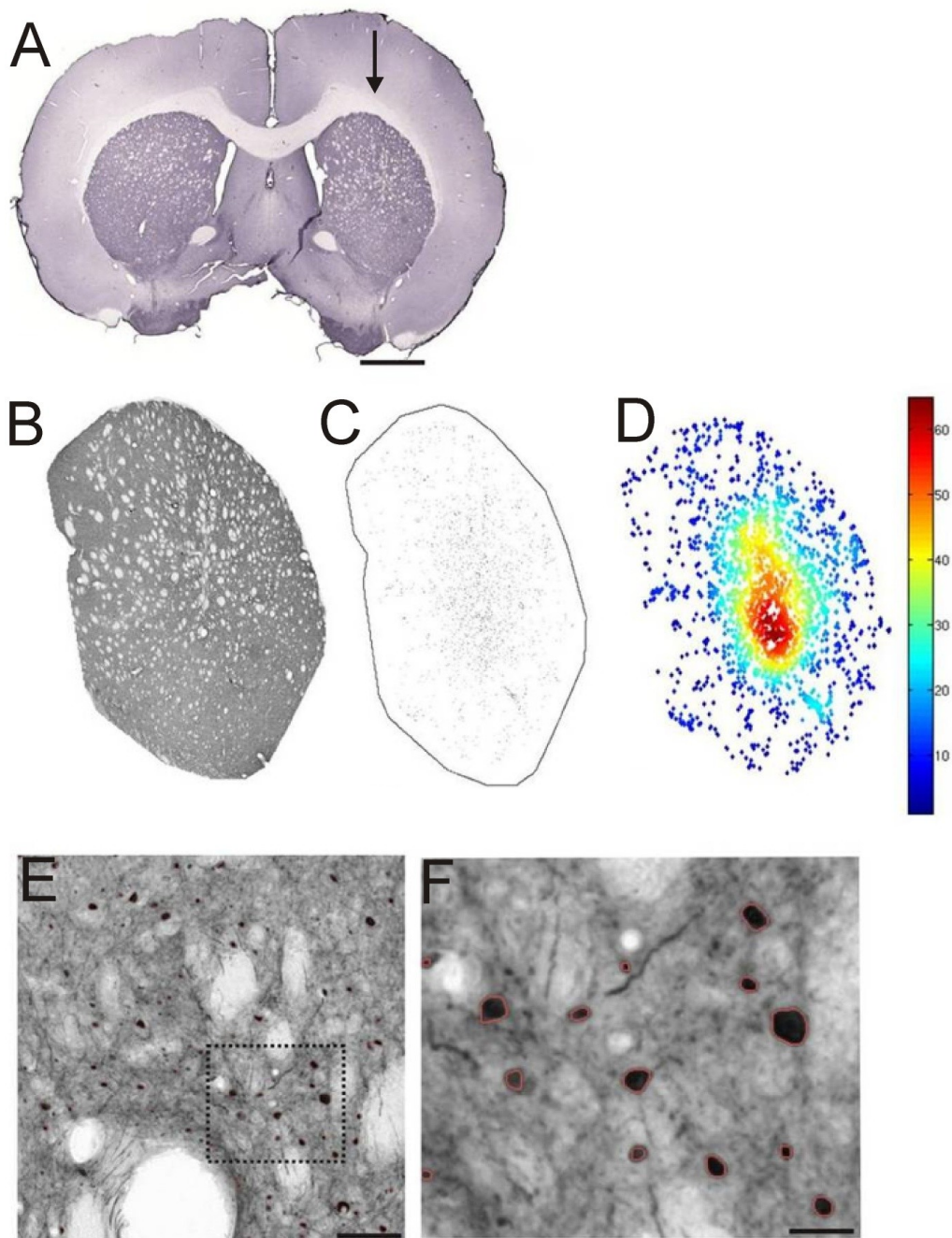


Abbildung 22.: Automatisierte digitale Messung der Zahl, Größe und Häufigkeit von BiVs anhand immunhistochemisch gefärbter Präparate

A) 30 μm dicker Frontalschnitt durch das Gehirn einer einseitig mit 2 ng BoNT-A behandelten Ratte. Der Pfeil markiert die Injektionsstelle im rechten Striatum. **B)** Das rechte Striatum wurde digital als Region des Interesses markiert. **C)** BiVs wurden durch einen Auswertalgorithmus erkannt, markiert und gezählt. **D)** Die konzentrische Dichteverteilung von Varikositäten wurde mittels einer Farbskala optisch dargestellt. **E)** und **F)** Die Varikositäten wurden von dem Programm automatisch erkannt, umgrenzt, hinsichtlich ihrer Größe und Verteilung gemessen und gezählt. **F)** Vergrößerter Ausschnitt aus **E)**. Der Maßstabsbalken in **A)** entspricht 2 mm, in **E)** 50 μm und in **F)** 10 μm .

3.5.4. Stereologie/ Auszählung der cholinergen Interneurone im Striatum

Die stereologische Auswertung von immunhistochemisch gegen ChAT angefärbten histologischen Präparaten dreier unilateral (rechts) BoNT-A-behandelter Gehirne ergab, dass sich auch sechs Monate nach BoNT-A-Applikation die Zahl cholinergischer Interneurone im linken und rechten Striatum nicht signifikant unterschieden. So fanden sich im Mittel im linken Striatum 27974 cholinerge Neurone und im rechten BoNT-A-behandelten Striatum 31000 cholinerge Neurone.

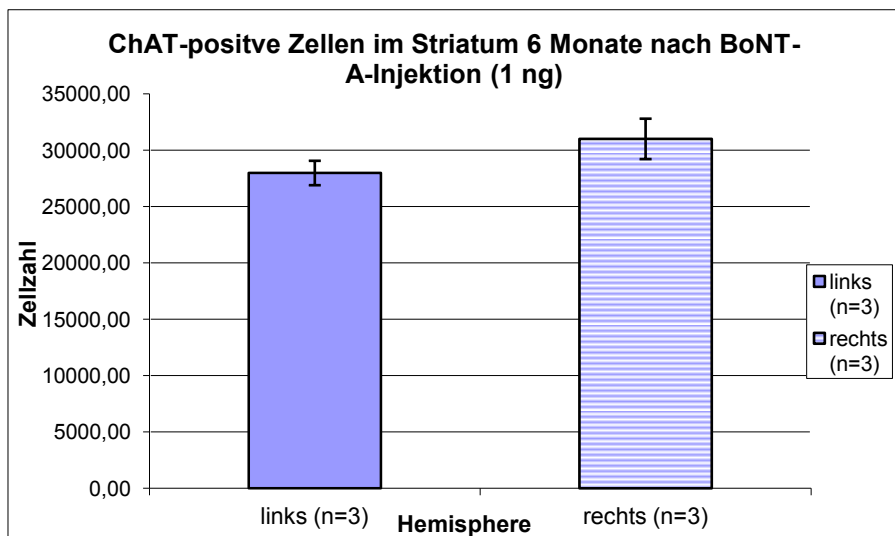


Diagramm 29.: Vergleich der Zahl cholinergischer Neurone des linken und rechten Striatums sechs Monate nach rechtsseitiger Applikation von 1 ng BoNT-A

Aufgeführt sind die mittleren Zahlen der cholinergen Interneurone des jeweils rechten CPU, in das sechs Monate zuvor 1 ng BoNT-A infundiert wurden, sowie die mittlere Zahl der cholinergen Interneurone der kontralateralen Striata dreier Wistar Ratten. Die Zahlen der cholinergen Nervenzellen im rechten und linken CPU unterschieden sich hierbei nicht signifikant voneinander, was gegen einen Untergang der cholinergen Interneurone aufgrund BoNT-A-Einwirkung spricht. Die Fehlerbalken geben die mittleren Standardfehler an.

3.5.5. Stereologie - Bestimmung der Gesamtzahl der Neurone im Striatum

Die Nissl-gefärbten Gehirnschnitte von einseitig BoNT-A-behandelten Ratten, in denen das CPU enthalten war, haben nach dem Färbeprozess, dem Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe und dem Eindeckeln vor allem durch den Wasserverlust an Volumen eingebüßt. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden Hirnschnitte mit einer Dicke von 30 µm angefertigt. Im Zuge des Auszählprozesses musste regelmäßig die Schnittdicke gemessen werden, diese betrug nun nur noch 10,3 - 11 µm.

Bei Ratten, die 12 Monate nach BoNT-A-Injektion in das rechte Striatum perfundiert worden sind (n=5), konnte eine durchschnittliche Neuronenzahl von 3044597 für das rechte CPU bei einem mittleren Standardfehler von 45415 und 3031282 bei einem mittleren Standardfehler von 37273 für das linke, unbehandelte CPU ermittelt werden. Im rechten, BoNT-A-

Ergebnisse

behandelten CPU von Tieren, die sechs Monate nach der BoNT-A-Applikation perfundiert worden sind, konnte eine durchschnittliche Nervenzellzahl von 2977130 bei einem mittleren Standardfehler von 19991 ermittelt werden und die mittlere Neuronenzahl für das linke Striatum betrug 3037250 bei einem mittleren Standardfehler von 798.

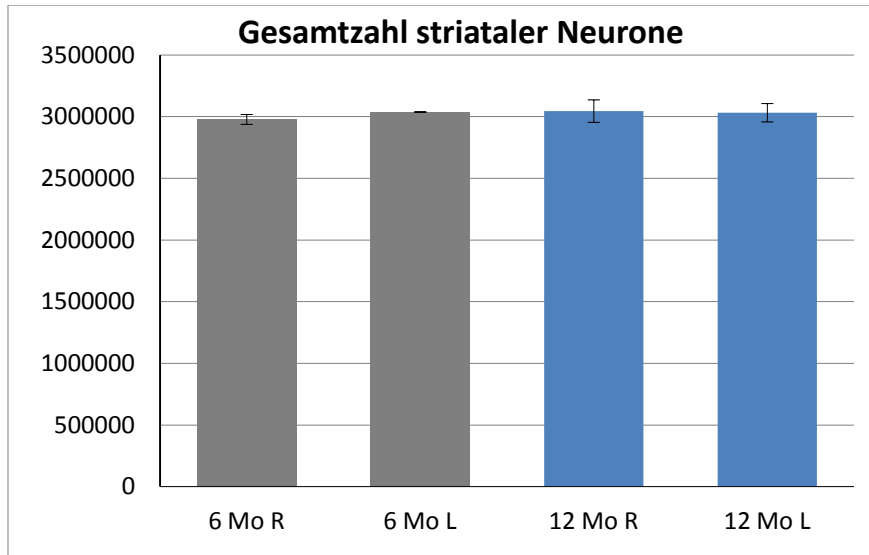


Diagramm 30.: Vergleich der Gesamtzahl der striatalen Neurone nach unilateraler BoNT-A-Behandlung über ein Jahr hinweg

An zwei Gehirnen von Tieren, die sechs Monate nach unilateraler BoNT-A-Injektion in das rechte Striatum perfundiert wurden, und an fünf Gehirnen von Ratten, die ein Jahr nach BoNT-A-Injektion getötet wurden, erfolgte eine Zählung sämtlicher Neurone des rechten und des linken Striatums anhand von Nissl-Färbungen. Im behandelten Striatum kommt es im Vergleich zu dem kontralateralen Striatum zu keiner signifikanten Veränderung der Neuronenzahl.

3.5.6. Stereologie – Volumenbestimmung des Striatums

Im Zuge der Zählung der Gesamtzahl der striatalen Neurone erfolgte eine gleichzeitige Volumenbestimmung der Striata. Hier konnte für das linke unbehandelte Striatum ein durchschnittliches Volumen von 41,095 mm³ bei einer mittleren Standardabweichung von 4,542 ermittelt werden und für das rechte, BoNT-A-behandelte CPU ergab sich ein mittleres Volumen von 37,822 mm³ bei einer mittleren Standardabweichung von 3,305 (**Diagramm 31**).

Ergebnisse

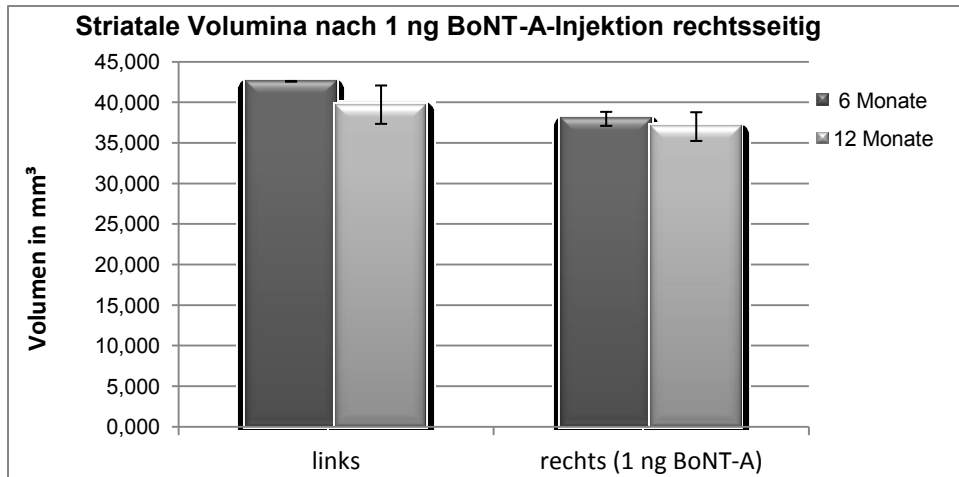


Diagramm 31.: Vergleich der Volumina (mm³) des BoNT-A-behandelnten, rechten CPu und des kontralateralen unbehandelten CPu von zwei Tieren, die sechs Monate nach BoNT-A-Applikation perfundiert wurden und von fünf Tieren, die ein Jahr nach BoNT-A-Behandlung getötet wurden

Die Werte wurden während der Zählung der Gesamtneuronenzahl in den Striata an Nissl-gefärbten Präparaten gewonnen. Die Unterschiede der Volumina von BoNT-A-infundiertem und unbehandeltem Striatum waren nicht signifikant. Die Fehlerindikatoren geben den mittleren Standardfehler an.

3.5.7. Elektronenmikroskopie

Ultrastrukturell ließen sich durch die transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Präparate von BoNT-A behandelten Striata die BiVs näher charakterisieren. Diese enthielten Mitochondrien und vesikuläre Strukturen, die zunächst nicht näher charakterisiert werden konnten (**Abb. 23**).

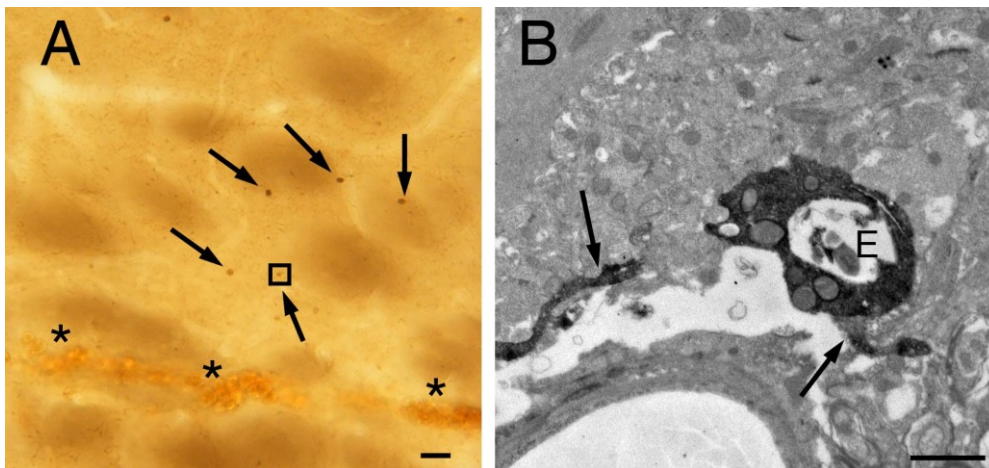


Abbildung 23.: Immunoelektronenmikroskopie

Es sind Gewebeschnitte durch ein CPu abgebildet, das mit 2 ng BoNT-A behandelt wurde. Es erfolgte eine immunhistochemische Anfärbung gegen TH. Ein lichtmikroskopisches Bild dieser Färbung ist in **A**) zu erkennen. Durch Sternchen ist hier der am unteren Bildrand zu erkennende Injektionskanal markiert. Die Pfeile markieren TH-positive BiVs. Exemplarisch wurde ein BiV mit einem Quadrat markiert. Der Maßstabsbalken entspricht hier 20 µm.

In **B**) ist ein transmissionselektronenmikroskopisches Bild eines ca. 3 µm großen TH-positiven BiVs zu sehen. Im Inneren des BiVs sind Mitochondrien und vesikuläre Strukturen zu erkennen. Zu sehen ist ebenfalls ein dilatiertes TH-reaktives Axon (mit Pfeilen markiert), in das das BiV eingeschaltet zu sein scheint. Hier entspricht der Maßstabsbalken 1 µm.

4. Diskussion

4.1. Dosisfindung, Verträglichkeit Ausschluss von Zytotoxizität

Im Zuge der Vorexperimente, die der Dosisfindung für die intrastriatale Applikation von BoNT-A dienten, wurden die in der Arbeit von Antonucci et al. (2008) angegeben Dosen für BoNT-A für die intrazerebrale Injektion in Mäuse auf Ratten hochgerechnet und stellten sich als gute Arbeitsgrundlage heraus. Eine Dosis von 2 ng BoNT-A je Striatum wurde toleriert, höhere Dosen nicht. In einer Arbeit von Luvisetto et al. (2003) wird berichtet, dass die Injektion höherer Dosen an Botulinumtoxin in die Ventrikel der Gehirne von Mäusen zu einer Abnahme der Herzfrequenz und der Körpertemperatur und schließlich zum Tod durch Herzstillstand und/ oder Atemlähmung führen kann. Die LD50 für männliche CD1-Mäuse, wurde durch Luvisetto et al. auf $0,5 - 1 \times 10^{-6}$ mg/kg Körpergewicht extrapoliert.

Die Komplikationen, die in vorliegender Arbeit beobachtet wurden, falls BoNT-A-Mengen ≥ 2 ng intrastriatal bei Wistar Ratte injiziert wurden und die bis zum Tod der Versuchstiere führen konnten, lassen sich evtl. dadurch erklären, dass ein Teil des BoNT-A in den Liquor der Ventrikel diffundierte und von hier aus die kreislaufregulierenden Zentren der Medulla oblongata erreichte und funktionell schädigte.

Anhand der Zählungen cholinergener Neurone im Striatum und der Auszählung der Gesamtzahl aller Neurone im BoNT-A-behandelten und unbehandelten Striatum, sowie aufgrund der morphologischen Betrachtung und der immunhistochemischen Anfärbung gegen Mikrogliazellen konnte ein zytotoxischer Effekt des BoNT-A in den hier angewandten Dosen weitestgehend ausgeschlossen werden.

4.2. Pharmakainduziertes Rotationsverhalten

4.2.1. Rotationsverhalten bei nur-BoNT-A behandelten Tieren

Die Analyse der Rotationsdaten führte zu dem Schluss, dass eine einseitige intrastriatale Applikation geringer Dosen an BoNT-A (100 pg) zu keinem Rotationsverhalten unter Apomorphin führt, die Injektion größerer Mengen von 1 bis 2 ng BoNT-A jedoch schwaches apomorphinstimuliertes Drehverhalten in Richtung der behandelten Hemisphäre von ca. -2 U/min auslöst. Apomorphin sollte in diesem Tiermodell auf beide Striata aufgrund seiner dominierenden D2-Rezeptoraffinität in gleicher hemmender Weise einwirken, da eine einseitige Vermehrung des D2-Rezeptorbesatzes bei gesunden Tieren nicht zu erwarten ist. Die Tatsache, dass die einseitig BoNT-A-behandelten Ratten unter Apomorphin negative Rotationen, also Rotationen im Uhrzeigersinn zur operierten rechten Seite hin ausführen,

spricht dafür, dass das rechte Striatum vermehrt GABAerg auf seine Projektionsgebiete, also hauptsächlich das Pallidum einwirkt, das rechte CPU hier also (unter Apomorphineinfluss) überaktiv ist oder zumindest aktiver als das unbehandelte CPU. Dies erscheint zunächst widersprüchlich, sollte doch durch die BoNT-A-vermittelte Blockade der cholinergen Interneurone eine Hemmung der GABAergen, auf das laterale Pallidumsegment gerichteten Projektionen erzielt werden. In der Konsequenz sollte dies zu einer Überaktivität des rechten motorischen Kortex führen, was aufgrund der Kreuzung der motorischen Leitungsbahnen zu stärkeren und vermehrten Bewegungen der Extremitäten der linken Körperhälfte führen und zu Drehungen entgegen dem Uhrzeigersinn führen sollte. Das Gegenteil war jedoch der Fall. Aufgrund der Beobachtung von TH-positiven BiVs ist es denkbar, dass durch den BoNT-A-Einfluss auch dopaminerge Afferenzen aus der SN funktionell beeinträchtigt sein könnten, so dass der native hemmende dopaminerge Einfluss im rechten Striatum ebenfalls herabgesetzt ist. Dem funktionshemmenden Effekt des BoNT-A auf das rechte Striatum aufgrund der Blockade der Acetylcholinausschüttung durch Interneurone würde nun ein unbekannt großer exzitatorischer Effekt auf das Striatum durch den Wegfall eines Teils der Afferenzen aus der SN gegenüberstehen. Denkbar ist es, dass bei einem gesunden Tier diese hypothetische exzitatorische Komponente der BoNT-A-Wirkung auf das Striatum, die inhibitorische übersteigt und wir aus diesem Grund einen Trend zu negativen Rotationen unter Apomorphineinwirkung bei diesen Tieren beobachten.

Dass Botulinumtoxin in der Lage ist, neben Acetylcholin auch die Ausschüttung weiterer Transmitter zu blockieren, wird bereits seit ca. drei Dekaden in der Literatur beschrieben (Ashton und Dolly, 1988; Bigalke et al., 1985; Pearce et al., 1997).

Die aufgestellte Hypothese könnte auch erklären, warum unter Amphetamineinwirkung meist überhaupt kein signifikantes Rotationsverhalten zu beobachten ist. Amphetamin ist ein Katecholaminfreisetzer. Die durch BoNT-A verursachte Beeinträchtigung katecholaminerger Afferenzen könnte demnach durch Amphetamin kompensiert werden, so dass sich wieder ein annäherndes Gleichgewicht in der Funktionalität beider Striata einstellt.

4.2.2. Ausbleiben apomorphininduzierter Rotationen im 6-OHDA-Hemiparkintiermodell: Ein Beweis für einen Durchbruch oder ein Versagen?

Bestimmte Kontingente GABAerger Projektionsneurone verfügen ebenso wie cholinerge Interneurone im Striatum über einen D2-Rezeptorbesatz (Pisani et al., 2007). Eine Aktivierung eines D2-Rezeptors führt über die Aktivierung eines inhibitorischen G-Proteins zu einer Hemmung der intrazellulären Adenylatzyklase und somit zu einer herabgesetzten

Diskussion

intrazellulären Konzentration an c-AMP und einer Aktivierung von Kaliumkanälen, woraufhin Kaliumionen ausströmen, was eine Vertiefung des Ruhepotentials bewirkt bzw. zu einem inhibitorischen Potential führt. Eine 6-OHDA-Läsion der SN auf einer Seite führt zu einem Wegfall des dopaminergen Inputs im Striatum und mittelfristig zu einer unilateralen kompensatorischen Hochregulierung der Expression von Dopaminrezeptoren an den striatalen Neuronen.

Gibt man solchen einseitig läsierten Tieren nun systemisch einen Blut-Hirn-Schrankegängigen D2-Rezeptoragonisten wie Apomorphin so wirkt dieser aufgrund des erhöhten Rezeptorbesatzes verstärkt auf der läsierten Seite. Im Falle eines rechtsseitig 6-OHDA-läsierten Tieres wird in Folge dessen der indirekte Weg der Basalganglienschleife auf der rechten Seite überaktiv. Konkret heißt das, dass Apomorphin rechtsseitig via D2-Rezeptoren die striatalen cholinergen Interneurone als auch die GABAergen Projektionsneurone aufgrund deren vermehrten D2-Rezeptorbesatzes stärker hemmt als linksseitig. Dadurch wird das rechte laterale Pallidumsegment weniger stark durch GABAerge Afferenzen aus dem CPU inhibiert und kann einerseits direkt durch GABAerge Efferenzen das mediale Pallidumsegment in seiner Aktivität dämpfen, andererseits indirekt, indem es durch GABA den STN hemmt, der nun weniger stark durch seine glutamatergen Efferenzen exzitatorisch auf das mediale Pallidumsegment einwirken kann. Hierdurch werden bewegungsfördernde Anteile des Thalamus durch das GPi weniger stark gehemmt, wodurch motorische Kortexregionen durch Glutamat verstärkt erregt werden. Aufgrund der Kreuzung der motorischen Pyramidenbahnen werden hierdurch vermehrt Bewegungen auf der kontralateralen Seite zur Läsion, also auf der linken Seite, von Extremitäten und Rumpf ausgeführt. Das rechtsseitig läsierte Tier fängt nach Apomorphingabe an, sich permanent nach links, entgegen dem Uhrzeigerinn, zu drehen. Die ursprüngliche Intention bei der intrastriatalen Gabe von BoNT-A war die cholinergen Interneurone daran zu hindern, vermehrt Acetylcholin aufgrund der fehlenden hemmenden, dopaminergen Afferenzen aus der SN auszuschütten. Im apomorphininduzierten Rotationstest zeigen BoNT-A-behandelte hemiläsierte Ratten tatsächlich ein Ausbleiben von pathologischen Rotationen. Hier stößt man zwangsläufig auf folgende Problematik: Bei Apomorphin handelt es sich um einen D2-Rezeptor-Agonisten. Dieser Test basiert damit auf einer übermäßigen Hemmung der D2-Rezeptor-überexprimierenden Neurone einschließlich der cholinergen Interneurone im zur 6-OHDA-Läsion ipsilateralen Striatum. Bei hemiläsierten, BoNT-A-behandelten Ratten wurde aber die Funktionalität der cholinergen Interneurone im Striatum ipsilateral zur Läsion durch BoNT-A-Injektion aufgehoben. Ein weiteres Herabsetzen der funktionellen Aktivität der cholinergen Interneurone und der

Diskussion

GABAergen Projektionsneurone auf der läsionierten Seite im Striatum hemiläsionierter Ratten durch Apomorphingabe müsste also in letzter Konsequenz entweder keinen weiteren Effekt auf die Rotationsrate haben oder es müsste sich bei den BoNT-A-behandelten hemiläsionierten Tieren im Vergleich zu unbehandelten hemiläsionierten Ratten nach Apomorphingabe sogar ein stärkeres Rotieren der Tiere einstellen. Doch das Gegenteil ist der Fall: ein nach 6-OHDA-Läsion und vor BoNT-A-Behandlung ermitteltes ausgeprägtes apomorphininduziertes Rotationsverhalten kontralateral zur Läsionsseite von mindestens 4 U/min verschwindet nach intrastriärer BoNT-A-Behandlung völlig. Bei unläsionierten BoNT-A behandelten Ratten müsste evtl. sogar das Auftreten von permanenten Rotationen entgegen dem Uhrzeigersinn denkbar sein. Dies wurde jedoch nicht beobachtet.

Vermutlich werden also durch die BoNT-A-Injektion in das Striatum und durch die langfristig ausbleibende bzw. stark verminderte Ausschüttung von Acetylcholin einige weitere adaptive Effekte im Striatum oder in der gesamten Basalganglienverschaltung ausgelöst.

Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass die durchgeführte Injektion von BoNT-A in das Striatum an (nur) jeweils zwei hintereinandergelegene Koordinaten in das Striatum erfolgte. Es kann aber zum Einen nicht vollkommen vorhergesagt werden, wie sich die BoNT-A-Lösung intrastriär bzw. intrazerebral verteilt, zum Anderen muss man davon ausgehen, dass durch Applikation von 1 ng BoNT-A nur ein großer Teil der cholinergen Axone, aber nicht alle im Striatum gelegenen cholinergen Axonendigungen an der Ausschüttung von Acetylcholin gehindert werden, da bei Gabe von 2 ng BoNT-A stärkere Effekte auf das Rotationsverhalten und den Vorderpfotengebrauch im Zylindertest beobachtet werden.

Betrachtet man die Verteilung der BiVs als Indikator für die dreidimensionale Ausbreitung von BoNT-A um die Injektionsstellen herum, so kann man davon ausgehen, dass die Peripherie des Striatums nur durch eine geringe Konzentration oder gar nicht von BoNT-A beeinflusst wird, es also eine Reihe von cholinergen Axonendigungen gibt, die in ihrer Fähigkeit Acetylcholin auszuschütten nicht oder nur geringfügig beeinträchtigt sind (Kapitel 3.5.3. **Abb. 22**). Ist dies der Fall, so können im BoNT-A-behandelten Striatum nach wie vor periphere Regionen durch eine Apomorphingabe funktionell beeinflusst werden, während Regionen in der Nähe der Injektionsstellen durch BoNT-A bereits funktionell ausgeschaltet sind und sich hier die Apomorphinwirkung weniger intensiv auswirkt.

Im mit 1 ng BoNT-A-behandelten Striatum lassen sich demnach Areale mit einer relativ unveränderten Funktionalität von Bereichen, die unter einer starken Wirkung des BoNT-A stehen, unterscheiden, wobei die Abgrenzung eher fließend verlaufen dürfte. Durch den Charakter der BoNT-A-Injektion liegt also ein partiell intaktes und partiell cholinerg (evtl.

auch dopaminerg) ausgeschaltetes Striatum vor. Hierdurch ließe sich durchaus erklären, warum es nach unilateraler BoNT-A-Injektion in gesunde Tiere auch nicht zu einem permanenten spontanen Rotationsverhalten in kontralaterale Richtung zur Injektionsseite hin kommt: Die vom BoNT-A unbeeinträchtigten Areale des Striatums haben anscheinend das Potential kompensatorisch den „Ausfall“ der unter BoNT-A stehenden Areale auszugleichen, wodurch eventuell nach wie vor eine normale Herabregulierung des motorischen Kortex möglich ist und ein theoretisches permanentes Rotieren entgegen der Injektionsseite ausbleibt. Es ist denkbar, dass zum Auslösen der theoretischen permanenten Rotationen mehr BoNT-A appliziert werden und/oder an weiteren Koordinaten des Striatums appliziert werden muss. Die hierfür nötige höhere Konzentration an BoNT-A im Striatum kann aber praktisch *in vivo* nicht erreicht werden, da aus oben genannten Pilotexperimenten mit Gaben von bis zu 5 ng BoNT-A und aus der Literatur (Luvisetto et al., 2003) bekannt ist, dass diese intrazerebralen Mengen an BoNT-A nicht mehr mit dem Leben vereinbar sind. Bevor also eine entsprechende Konzentration an BoNT-A im Striatum erreicht wird, die zur funktionellen Ausschaltung einer kritischen Menge an cholinergen präsynaptischen Endigungen führen kann, die zu einer Permanentrotation führen könnte, tritt der Tod der Tiere ein.

Zusammenfassend muss konstatiert werden, dass das Ausbleiben von apomorphininduzierten Rotationen in striatal BoNT-A-behandelten Ratten, die zuvor mittels 6-OHDA hemiläsioniert wurden, keinen hinreichenden Beweis dafür darstellt, dass eine BoNT-A-Behandlung für die Aufhebung der Hypo- oder Bradykinese beim MP geeignet ist.

4.2.3. Amphetamininduzierte Rotationen bei hemiläsionierten Tieren

Läsionierte Ratten rotierten im Durchschnitt acht Mal in der Minute ipsilateral zur Läsionsseite unter Amphetamin. Eine Abnahme dieser Rotationen bei hemiläsionierten Tieren, die ipsilateral zur Läsion striatal mit BoNT-A behandelt wurden, war nicht zu beobachten und auch nicht zu erwarten. Der Verlust an dopaminergen Afferenzen in der läsionierten Hemisphäre blieb nach wie vor gegeben. Amphetamin als Dopaminfreisetzer konnte seine Wirkung demnach nur im Striatum der unläsionierten Hemisphäre entfalten und hier zu einem temporären Überangebot an Dopamin im Striatum führen, was über den oben beschriebenen direkten und indirekten Weg zu einer Überaktivierung des motorischen Kortex auf der linken Seite geführt hat.

Die Rotationsrate unter Amphetamin lag sogar nach gleichzeitiger intrastriataler Behandlung mit 2 ng BoNT-A durchschnittlich um zwei Rotationen in der Minute höher. Dies kann evtl.

dadurch erklärt werden, dass durch die hochkonzentrierte BoNT-A-Behandlung (2 ng) auch eine funktionelle Beeinträchtigung benachbarter Kerngebiete eintritt.

Die nicht leicht zu erklärenden Rotationsergebnisse bei Apomorphin- und Amphetamingabe nach BoNT-A-Behandlung können durchaus auf eine Veränderung des Rezeptorbesatzes einer ganzen Reihe von Interneuronen und Projektionsneuronen verschiedener Kerngebiete zurückzuführen sein. Klare Aussagen diesbezüglich sind ohne eine Analyse des Rezeptorbesatzes der involvierten Kerngebiete der Basalganglienschleifen nach BoNT-A-Injektion in das Striatum mit und ohne vorheriger 6-OHDA-Läsion der SN nicht möglich. Eine solche Analyse sprengte den verfügbaren Zeitrahmen der vorliegenden Arbeit und ist derzeit laufenden autoradiographischen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Jülich vorbehalten (siehe Ausblick).

4.3. Nichtpharmakainduzierte Motoriktests

Aufgrund der Ergebnisse, die im Accelerod mit hemiläsionierten BoNT-A-behandelten Ratten und den verschiedenen Kontrolltiergruppen gewonnen wurden, lässt sich schließen, dass die Tiere durch die intrastriatale BoNT-A-Behandlung keine Verbesserung erlangen, sich durch koordinierte Bewegungen und Ausdauer auf der sich beschleunigenden rotierenden Walze zu halten. Da es aber nie signifikante Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen gegeben hat, muss man davon ausgehen, dass dieser Test ungeeignet ist, mögliche positive Einflüsse einer Applikation von BoNT-A im CPU auf Gleichgewicht, Bewegungskoordination und Ausdauer bei Hemiparkinsonstiermodellen zu erfassen.

Der durch die Hemiläsionierung dominierende ipsilaterale Vorderpfotengebrauch hat sich nach BoNT-A-Behandlung teilweise wieder aufgehoben, was für eine partielle Wiederherstellung der nativen Motorkortexerregung durch die Basalganglienschleife spricht. Es überrascht jedoch, dass dieser positive Effekt, erst drei Monate nach BoNT-A-Applikation zu beobachten war. Eine reine Inhibierung der Acetylcholinausschüttung durch die striatalen Interneurone scheint nicht die alleinige Ursache für die Verbesserungen zu sein, sondern es müssen weitere langfristige adaptive Prozesse, wie eine Änderung des Rezeptorbesatzes in einer oder mehreren Stationen der Basalganglienschleife angenommen werden. Möglich ist auch, dass in der Frühphase das operationsbedingte Trauma im rechten CPU nach BoNT-A-Injektion einen vorteilhaften Einfluss des BoNT-A auf die linksseitige Motorik (gekreuztes motorisches System des ZNS - rechtes CPU verantwortlich für linksseitige Motorik) überdeckt, denn dem **Diagramm 10** ist zu entnehmen, dass es nach Schein-BoNT-A-

Applikation zu einem Trend für einen vermehrten Gebrauch der rechten Pfote im Zylindertest kommt.

Um den Einfluss des intrastriatalen BoNT-A auf spontanmotorische, kognitive und emotionale Leistungen unabhängig von jeglichem Krankheitsgeschehen beurteilen zu können, wurden bilaterale BoNT-A-Injektionen gesunder Tiere vorgenommen. Es war zu erwarten, dass deren motorisches Verhalten negativ beeinflusst wird. Jedoch zeigten die Tiere weder im Water Maze noch im Elevated Plus-Maze-Test oder im Radial Maze signifikante motorische Einschränkungen. Lediglich im Accelerod-Test, bei dem ein intakter Gleichgewichtssinn und die Fähigkeit koordinierte Bewegungen auszuführen von großer Bedeutung sind (Bogo et al., 1981) und hauptsächlich getestet wurden, schnitten bilateral BoNT-A behandelte Ratten schlechter ab als unbehandelte Tiere. Doch auch scheinbehandelte Tiere wiesen signifikant schlechtere Fähigkeiten auf, sich auf der beschleunigt rotierenden Rolle zu halten. Die Beeinträchtigung war allerdings nicht so stark wie bei BoNT-A-behandelten Ratten, was dafür spricht, dass zwar die operationsbedingten Traumata im Striatum zu einer Störung der Basalganglienverschaltung führen, aber BoNT-A diese noch verstärkt. Eine Blockierung der normalen Ausschüttung von Acetylcholin durch die cholinergen Interneurone im Striatum hat eine Verminderung des Acetylcholingehaltes im Striatum zur Folge, die bekannter Maßen zu Einschränkungen in der Motorik führt (Day et al., 1991). Zu erwähnen ist, dass zwar auch die Gesamtlaufstrecke bilateral BoNT-A-behandelter Ratten im Open Field signifikant verringert war, man aber dieses Ergebnis nicht eindeutig auf Störungen motorischer Verschaltungen zurückführen kann, sondern auch die Komponente der Ängstlichkeit und Motivationsabnahme der Tiere hier eine entscheidende Rolle spielt.

Hingegen sollte im 6-OHDA-Hemiparkinsonmodell der Ratte ein einseitiger Hypercholinismus im rechten Striatum vorherrschen, der zu Beeinträchtigungen der spontanen motorischen Aktivität und ebenfalls zu Defiziten im Accelerod-Test führt und durch Hemmung der übermäßigen Acetylcholinausschüttung durch BoNT-A-Applikation aufzuheben wäre. Überraschender Weise gab es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen hemiläsionierten, BoNT-A-behandelten Ratten, hemiläsionierten, scheinbehandelten Ratten und scheinläsionierten, scheinbehandelten Ratten. Womöglich überdecken bzw. überschneiden sich die Effekte der operationsbedingten Traumata in Striatum und MVB mit den Auswirkungen von 6-OHDA-Läsion und BoNT-A-Wirkung, so dass sogar bei den scheinläsionierten und scheinbehandelten Tieren die Fähigkeit auf dem Accelerod zu verbleiben, der der anderen beiden Tiergruppen angenähert ist, und dass eine

Verbesserung dieser Fähigkeit bei läsierten Tieren nach BoNT-A-Behandlung nicht beobachtet werden konnte.

Es könnte sein, dass geänderte Dosierungen des BoNT-A eindeutige Ergebnisse liefern, und dass nach schonenderen Operationsmethoden (dünnere Kanülen) gesucht werden muss, um den Gewebeschaden im Hirnparenchym möglichst gering zu halten.

4.4. Botulinumtoxin-A und Kognition

Bisherige Veröffentlichungen zu der Anwendung von BoNTs im ZNS deuten darauf hin, dass die Gefahr kognitiver Einbußen bei intrastriärer Injektion besteht (Ando et al., 2002; De Leonibus et al., 2011). Es gilt als sicher, dass beim Beginn der Alzheimerschen Erkrankung, von der vorwiegend das cholinerge System betroffen ist, ein neuronaler Zellverlust in der entorhinalen Rinde eintritt (Mizutani & Kasahara, 1997; Morrison & Hof, 1997; Price et al., 2001). Diese grenzt dem Striatum zwar nicht unmittelbar an, liegt aber dennoch in relativer Nähe zu diesem. Desweiteren sind hauptsächlich cholinerge Neurone des Nucleus basalis Meynert und Hippocampus durch die degenerativen Prozesse beim Morbus Alzheimer betroffen (Coyle et al., 1983). Auch ist bekannt, dass systemisch verabreichte Anticholinergika zu kognitiven Einbußen führen (Campbell et al. 2009). In einer Arbeit von De Leonibus et al. (2011) wurde festgestellt, dass männliche erwachsene CD1 Mäuse nach BoNT-A-Injektion (25 pg) in das dorsomediale und dorsolaterale Striatum noch in der Lage sind sich im „dual-solution plus maze“ zu merken, in welchem von zwei Armen sich Futter befindet und das ohne signifikante Unterschiede zu gesunden Tieren aufzuweisen. Jedoch haben sie Schwierigkeiten, sich auf Veränderungen in den Versuchsbedingungen einzustellen. Durch Ando et al. (2002) wurde sogar ein Tiermodell des Morbus Alzheimer etabliert, bei dem durch Injektion von BoNT-B in den entorhinalen Kortex von Fischer Ratten eine Demenz ausgelöst wurde. So behandelte Tiere schnitten in Lerntests schlechter ab als unbehandelte Tiere. Auch Lacković et al. (2009) beschrieben, dass die intrazerebroventrikuläre Injektion von BoNT-A (25 pg - 200 pg) die Lernfähigkeit von Ratten im Water Maze für mindestens ein Jahr beeinträchtigt. Cholinerge Verschaltungen im Hippocampus sind immanant wichtig für die Überführung von Kurzzeitgedächtnisinhalten in Langzeitgedächtnisinhalte (Doralp und Leung, 2008).

Ein Übergreifen der anticholinergen striatalen BoNT-A-Wirkung auf Schlüsselregionen des Lernens wie den Hippocampus, die entorhinale Rinde und den Nucleus basalis Meynert wäre also auch im Rahmen der vorliegenden Experimente nicht von vornherein auszuschließen. Die Intention dieser Arbeit war es jedoch, durch gezielte punktuelle Applikation eines

hochwirksamen Blockers der Acetylcholinausschüttung selektiv auf für die Motorik und nicht auf die für die Kognition wichtige Zentren einzuwirken. Ob diesem Anspruch Genüge getan wurde, sollten Untersuchungen mit den Kognitionstests Water Maze Test und Radial Maze Test zeigen.

Es wurden deshalb umfangreiche Versuche durchgeführt um den Effekt von doppelseitig applizierten BoNT-A in normalen Ratten auf mögliche Kognitionsveränderungen zu prüfen. Der Gruppe der Doppel-BoNT-A-behandelten Tiere wurden die Gruppe der Doppel-Sham-BoNT-A-Ratten (Vehikelinjektionen) und die Gruppe der naiven Kontrollen (nichtinjizierte Normaltiere) gegenübergestellt.

Im Radial Maze ließen sich zwischen BoNT-A-behandelten und unbehandelten Tiergruppen keine Unterschiede des Referenzgedächtnisses feststellen. Lediglich bei der Testung des Arbeitsgedächtnisses gab es leichte, aber signifikante Unterschiede zwischen beidseitig BoNT-A-behandelten Ratten und gänzlich unbehandelten Ratten, jedoch nicht zu scheinbehandelten Ratten. Es liegt nahe, dass die Einschränkungen im Arbeitsgedächtnis den operationsbedingten Traumata geschuldet sind. Dass solche kognitiven Störungen durch operative Scheineingriffe in das Striatum möglich sind, wurde bereits durch Lu et al. (1990, 1991) gezeigt.

Durch die im Water Maze ermittelten Daten gibt es zwar erste Indizien für ein leicht eingeschränktes räumliches Lernvermögen bei bilateral BoNT-A-behandelten Ratten. Dies konnte aber im Verlauf der weiteren Trainings- und Testphasen nicht verifiziert werden. Es muss erwähnt werden, dass unter Umständen der hier verwandte Versuchsaufbau, zumindest für die Untersuchung des hippocampalen Lernens, nicht optimal war. Dies ist den räumlichen Gegebenheiten des Instituts für Anatomie Rostock geschuldet, die einen Aufbau eines größeren Water-Maze-Systems nicht zulassen.

Von einigen Arbeitsgruppen wird postuliert, dass für Mäuse (!) ein Water Maze mindestens einen Durchmesser von 2 m haben sollte, um hippocampales Lernen untersuchen zu können (First et al., 2011; Garthe et al., 2009; Morris, 1984; Rockenstein et al., 2011). Das von uns verwandte Water Maze Becken, mit dem wir unsere Versuchsratten getestet haben, hatte allerdings nur einen Durchmesser von einem Meter.

4.5. Bilaterale intrastriatale BoNT-A-Applikation und Emotion/Angstverhalten

Die doppelte Funktion des Open-Field-Testes bei der Untersuchung von Tieren, die bilateral mit BoNT-A behandelt wurden, bestand darin, den Einfluss der divergenten Motivationen der

Ratten, neue, unbekannte Umgebungen erkunden zu wollen, aber gleichzeitig freie, hell erleuchtete Flächen zu meiden, zeitgleich mit der Testung des motorischen Verhaltens zu erfassen. Wie bereits erwähnt, bewegten sich die beidseitig BoNT-A-behandelten Tiere signifikant weniger im Open Field als Kontrolltiere. Dies kann der Tatsache geschuldet sein, dass durch die bilaterale BoNT-A-Applikation und den dadurch verringerten striatalen Acetylcholingehalt die Basalganglienneuronenschleifen derart gestört sind, dass sich eine Symptomatik ähnlich der einer späten Phase der Chorea Huntington einstellt, die durch eine Bewegungsarmut gekennzeichnet ist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Berichten von Luvisetto et al. (2003, 2004), die nach intrazerebroventrikulärer Injektion von BoNT-A in Mäusen ebenfalls eine verminderte motorische Aktivität beobachtet haben.

Zum Anderen haben die doppelseitig BoNT-A behandelten Ratten ein verringertes Angstverhalten gezeigt, indem der Anteil der besuchten Quadranten, die sich im Zentrum des Open Field befanden und die nicht an einer Wand angrenzten, in Bezug auf die gesamte zurückgelegte Strecke signifikant höher war als bei scheinbehandelten und gänzlich unbehandelten Kontrollratten. Jedoch war auch die Defäkation der BoNT-A-behandelten Ratten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollratten höher. Wie erwähnt spricht dies im Allgemeinen für eine vermehrte Ängstlichkeit. Die Interpretation dieser eigentlich konträren Ergebnisse ist schwierig. Es besteht die spekulative Möglichkeit, dass Stoffwechselzentren im Hypothalamus und/oder Defäkationszentren im Hypothalamus und in der Amygdala selbst durch die BoNT-A-Behandlung beeinflusst worden sind, wodurch die erhöhte Defäkation nicht mehr durch eine erhöhte Ängstlichkeit zu erklären wäre. Allerdings gibt es hierfür zunächst keine Anhaltspunkte, denn die Körpergewichte der Tiere unterschieden sich nicht signifikant und auch morphologisch ließen sich bisher keine Veränderungen im Hypothalamus und in der Amygdala feststellen.

Die kombinierte Erfassung von Motivation und Ängstlichkeit durch den Open-Field-Test macht die isolierte Interpretation dieser Ergebnisse schwierig (Denenberg, 1969). Aus diesem Grund wurde auch der Elevated-Plus-Maze-Test durchgeführt. Hier ergaben sich mit dem Fisher-LSD- oder Student-Newman-Keuls-Test signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen. So waren die bilateral BoNT-A-behandelten Tiere weniger ängstlich als die der anderen beiden Tiergruppen. Dieser eventuelle anxiolytische Effekt einer intrastriatalen BoNT-A-Behandlung könnte sich bei einem therapeutischen Einsatz am Menschen als vorteilhaft erweisen, denn 40% aller MP-Patienten leiden an Depressionen und/oder Angststörungen (Poewe, 2008; Tolosa et al., 2007). Tadaiesky et al. (2008) stellten in Übereinstimmung damit an intrastriatal mit 6-OHDA behandelten Ratten eine erhöhte

Ängstlichkeit und kognitive Defizite fest. Der durch den Verlust an dopaminergem Input bei MP ausgelöste Hypercholinismus scheint die Ursache für die besagten Angststörungen zu sein und könnte wirksam durch eine intrastriatale BoNT-A-Applikation therapiert werden.

4.6. Botulinum Neurotoxin A induzierte Varikositäten - ein alter Bekannter? - Axonales Ballooning oder Retraction bulbs?

Nach BoNT-A-Injektion in das Striatum von Wistar Ratten ließen sich noch Monate post operationem TH- und ChAT-positive Varikositäten im CPU, im piriformen Kortex sowie im Tuberculum olfactorium auffinden. Es fällt auf, dass diese, von uns als BiVs bezeichneten Strukturen, Ähnlichkeit mit einer seit den 70er Jahren beschriebenen degenerativen Erscheinung von Axonen nach Leitungs- oder Efferenzgebietsläsion haben, dem sogenannten "Ballooning" von Axonen und Synapsen. Prinzipiell werden axonale Schwellungen bei einer ganzen Reihe von axonalen Schädigungen aufgefunden. So könne sie z. B. durch β -Synuclein-Mutation (Fujita et al. 2010), durch chemische/ toxische Einflüsse und durch mechanische Einwirkung verursacht werden.

Von Cuénod et al. (1970) wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen beschrieben, die zeigten, dass 12 bis 24 h nach einseitiger Entfernung der Retina von Tauben die synaptischen Vesikel im Tectum opticum sich zu vergrößern beginnen, so dass sie nach vier Tagen um 40% an Größe zugenommen haben, zwei Wochen um 100%. Dabei soll die Gesamtzahl der Vesikel abgenommen haben. Untersucht wurden sowohl axo-dendritische als auch axo-somatische Synapsen. Strukturelle Veränderungen im synaptischen Spalt oder in der postsynaptischen Membran konnten nicht beobachtet werden. Die Autoren berichten von einem vermehrten Vorkommen an Gliazellen um degenerierende axonale Endigungen und spekulieren darüber, dass die Vergrößerung der Vesikel mit einer vermehrten Flüssigkeitsaufnahme in Verbindung steht. Eine strukturelle Ähnlichkeit der von Cuénod et al. beobachteten Veränderungen, die als „ballooning“ bezeichnet wurden und den in dieser Arbeit beschriebenen BiVs ist unwahrscheinlich, da in unserem experimentellen Ansatz nicht die Zerstörung der Efferenzneurone und somit das Abschneiden von Axonen von ihrer Versorgung vollzogen wurde und die BiVs auch über einen sehr langen Zeitraum (bis zu ein Jahr) hinweg zu beobachten waren.

Sphärische axonale Anschwellungen wurden auch von Carmichael et al. (1993) im ZNS von Katzen, die an der erblichen felines neuroaxonalen Dystrophie erkrankt waren, beschrieben. Die Tiere entwickelten im Alter von sechs bis neun Monaten Lähmungen, wobei man sowohl elektronenmikroskopisch als auch in HE-Färbungen von Präparaten aus dem Hirnstamm und

dem Innenohr, die in diesem Krankheitsstadium gewonnen wurden, die sphäroiden Anschwellungen fand. Deren Durchmesser betrug 8 - 35 μm und Vakuolen im Neuropil hatten einen Durchmesser von 10 bis 150 μm . Die Vakuolen schienen aus mehreren Kompartimenten zu bestehen. In den Hirnstammkernen sowie im Kleinhirn kam es zu einem Nervenzellverlust. Im Kleinhirn waren vor allem Purkinjezellen betroffen. Leitungsbahnen wie der Fasciculus cuneatus und Fasciculus gracilis waren ebenfalls involviert. In einigen Axonen war das Axoplasma durch Vakuolen ersetzt. Auch wurden hier eine Gliose und eine Ansammlung von Mikroglia beschrieben. Die von Carmichael et al. (1993) beschriebenen degenerativen Erscheinungen lassen sich im Endeffekt auch nicht mit den von uns beschriebenen BiVs gleichsetzen, da die Autoren bereits in HE- und Bodian-Färbungen deutliche Vakuolen fanden, deren Durchmesser (bis 150 μm) die der BiVs (max. 10 μm) erheblich überschreiten. Auch scheinen die Veränderungen, die Carmichael et al. (1993) beschrieben, auf einen eindeutigen Nervenzelltod zurückzugehen, den wir in unseren Experimenten nicht beobachten konnten.

Drenckhahn beschrieb 1977 bei Ratten, die mit dem Appetitzügler Chlorphentermin oder dem trizyklischen Antidepressivum Iprindol behandelt wurden, axonales „Ballooning“, das er mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden im Innenohr nachwies. Die axonalen Erweiterungen enthielten in dem Fall osmiophile Einschlüsse und autophagische Vakuolen.

Feldman und Peters beschrieben 1998 „Ballooning“ in Gehirnen älterer Makaken und im auditorischen Hirnstamm älterer Ratten und Rennmäuse. Sie kamen allerdings anhand ihrer elektronenmikroskopischen Studien zu dem Schluss, dass hier lediglich die Myelinscheiden erweitert und die darin enthaltenen Axone noch intakt waren.

Auch beim Menschen wurden bereits axonale Anschwellungen dokumentiert, so im Rahmen eines Fallberichtes von Peress und Kim aus dem Jahr 1973 über einen 52-jährigen Patienten, der an einer akuten neurologischen Erkrankung verstarb, deren genauer Charakter und Ursachen unbekannt waren. Sie ging mit Muskelschwäche, Verwirrtheit und Fieber einher. Post mortem wurden in dem Gehirn des Patienten massive axonale Anschwellungen in diversen Leitungsbahnen des Hirnstammes sowie des Balkens gefunden.

1987 konnten Tago et al. auch in Gehirnen von Alzheimerpatienten neben den bekannten senilen Plaques axonales Ballooning im Hippocampus, frontalen Kortex, der inneren Kapsel und dem Putamen entlang AChE-positiver Axone auffinden, wobei einzelne Fasern oft mehrere Schwellungen hintereinander aufwiesen. Bekanntlich sind beim Morbus Alzheimer zunächst cholinerge Strukturen betroffen, was diesen Bericht im Zusammenhang mit unseren Befunden interessant macht. Allerdings wurde hier auch ein deutlicher Neuronenverlust und

Diskussion

ein Schrumpfen und irregulärer Phänotyp vorhandener Neurone festgestellt, was im Allgemeinen Anzeichen eines beginnenden Nervenzelltodes sind. Vergleichsweise hat diese Arbeitsgruppe bei drei Ratten die rechte Substantia innominata läsiert, woraufhin in den Gehirnen der Tiere ähnliche Veränderungen wie bei den Alzheimergehirnen zu finden waren. Es liegt also die Vermutung nahe, dass das hier beobachtete axonale Ballooning auf ein Absterben des dazugehörigen Perikaryons zurückgeht. Einen solchen Nervenzelltod konnten wir nach BoNT-A-Gabe ausschließen. Desweiteren waren die beobachteten Anschwellungen bei Tago et al. von einem AChE-positiven Halo umgeben. Ähnliche Veränderungen konnten wir in AChE-Färbungen jedoch nicht beobachten.

Die Arbeitsgruppe von Wang et al. (2010) berichtete, dass auch mechanische Traumata, wie sie z. B. bei Gehirnerschütterungen auftreten, axonale Schwellungen im Hirnparenchym hervorrufen. Hierzu wurde unter kontrollierten Bedingungen aus definierten Winkeln heraus, durch das Fallen eines Gewichtes ein Impuls auf den Schädel von Ratten gegeben. In den nachfolgenden Analysen der Gehirne wurden axonale Schwellungen aufgefunden. Diese waren immunreaktiv für amyloides Vorläuferprotein. Ansammlungen von amyloidem Vorläuferprotein sind in der Regel Begleiterscheinungen von neurodegenerativen Prozessen. Die aufgefundenen axonalen Anschwellungen wurden als sogenannte "Retraction bulbs" gedeutet und bezeichnet.

Es ist möglich, dass es sich bei den von uns beobachteten BiVs um sogenannte Retraction bulbs (auch Retraction balls) von cholinergen und dopaminergen Axonen handelt, die lange nach einem traumatischen Ereignis persistieren können (Ertürk et al., 2007). Retraction bulbs sollen im Zeitverlauf aufgrund einer Destabilisierung der Mikrotubuli, im Gegensatz zu Wachstumskegeln an Größe zunehmen (Ertürk et al., 2007). Tatsächlich erschienen auch BiVs, die in Präparaten von Tieren, die 9 oder 12 Monate nach BoNT-A-Injektion überlebt haben, deutlich größer als BiVs von Tieren, die nur einen Monat oder drei Monate überlebten. Da in der Immunhistochemie keine axonalen Wachstumskegel markiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass eine Neuaussprossung der Axonendigungen nicht stattgefunden hat, sondern diese sich degenerativ zu Retraction bulbs verformt haben. Die Rotationsergebnisse über die Zeit sprechen allerdings gegen diese Annahme, denn es kommt in hemiläsionierten Ratten sehr wohl zu einer partiellen Rückkehr des pathologischen Rotationsverhaltens. Denkbar ist, dass nur ein Teil der betroffenen Axonendigungen sich dauerhaft zu Retraction bulbs deformiert und später in der Immunhistochemie die Darstellung von TH- bzw. ChAT-positiven verursacht.

Diskussion

Im Allgemeinen gelten Retraction bulbs oder auch Verkürzungsknollen als eine Struktur, die sich am Ende eines degenerierenden Axons befindet. Ertürk et al. (2007) konnten auch einige vorgeschaltete Verdickungen an entsprechenden Axonen nachweisen. Wir konnten ebenfalls mehrfach beobachten, dass mehrere BiVs in die Axone eingeschaltet sind. Zum Teil erscheinen diese sogar perlschnurartig aufgereiht.

Retraction balls im Hirnparenchym, die den von uns aufgefundenen BiVs sehr ähneln, wurden auch in der Arbeit von Gennarelli (1982) dokumentiert, nachdem man bei Affen durch kontrollierte Beschleunigung der Köpfe Gehirnerschütterungen mit anschließender Bewusstlosigkeit ausgelöst hatte. Auch in der forensischen Medizin sind diese Erscheinungen im Zusammenhang mit Todesfällen von Kleinkindern und Neugeborenen bekannt, denen missbräuchlich durch Schütteln ein schweres Schleudertrauma mit Todesfolge zugefügt wurde (Vowles et al., 1987). Marmarou et al. (2005) konnten nach mechanischer Schädigung von Rattengehirnen durch starke Impulsgabe auf den Schädel der Tiere mittels immunhistochemischer Anfärbung gegen Amyloides Vorläuferprotein und Verdichtungen von Neurofillament in einigen Faserbahnen der Gehirne ebenfalls axonale Anschwellungen nachweisen. Allerdings betrug der Beobachtungszeitraum hier maximal 24 h nach Traumainduktion.

Durch Berliocchi et al. (2005) wurden axonale Anschwellungen auch im Zusammenhang mit der Anwendung eines BoNT beschrieben. Hier wurde allerdings BoNT-C zu kultivierten Neuronen von Mäusen gegeben, woraufhin deren Axone Auftreibungen ausbildeten, die als "blebs", also Blasen, bezeichnet wurden. Desweiteren wurde hier ein apoptotischer Untergang von Neuronen beschrieben.

Anschwellungen, Auftreibungen, Blasen und vakuolenartige Veränderungen im Hirnparenchym in und an Axonen wurden also bereits mehrfach beschrieben und scheinen mannigfaltigen Charakter sowie verschiedene Ursachen zu haben. Durch unsere jetzigen Befunde kann lediglich ausgeschlossen werden, dass es sich bei BiVs um Wachstumskegel handelt. Für eine genauere Charakterisierung stehen Färbungen gegen amyloides Vorläuferprotein, weitere elektronenmikroskopische Studien sowie Untersuchungen in der Zellkultur aus. So muss z. B. auch geklärt werden, ob Axone, die BiVs aufweisen, weiterhin funktionell aktiv sind, ob sie also Aktionspotentiale in einer normalen Geschwindigkeit und Amplitude weiterleiten und ob deren synaptische Endigungen, so vorhanden, zur Transmitterausschüttung in der Lage sind. Patch clamp-Untersuchungen sind hierfür nötig.

Diskussion

Interessanter Weise konnten wir in den mit BoNT-A behandelten Striata nicht nur Veränderungen der cholinergen Strukturen beobachten, sondern auch das Vorkommen von TH-positiven Varikositäten nachweisen. Da diese bei vorheriger Läsion der ipsilateralen SN nicht aufzufinden sind, müssen die TH-positiven Varikositäten axonale Veränderungen der dopaminergen Neurone der SNpc sein. Es kann also geschlossen werden, dass in Hemi-Parkinsonratten neben cholinergen Axonendigungen auch dopaminerge Axonendigungen durch BoNT-A beeinträchtigt werden. Weitere Transmittersysteme scheinen nicht durch die intrastriatale BoNT-A-Applikation beeinflusst zu sein, wie man aus den histologischen Befunden schließen kann.

Der unterschiedliche Besatz der Neurone mit SV2-Subtypen könnte eine Erklärung für diese Beobachtungen sein. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, dienen die synaptischen Vesikelproteine 2 (SV2) als Rezeptor und damit als zelluläres Einfallstor für BoNT-A. Janz und Südhof (1999) konnten immunhistochemisch nachweisen, dass der SV2-Subtyp SV2C nur in bestimmten, phylogenetisch alten Hirnarealen exprimiert wird, wie z. B. im Bulbus olfactorius und CPU sowie in der SN, der Brücke und der Medulla oblongata. Auch Dardou et al. (2011) haben immunhistochemisch und durch in situ Hybridisierung eine Expression von SV2C im Kortex nur in Teilen des Cingulums und des lateralen entorhinalen Kortex nachweisen können, jedoch übereinstimmend mit Janz und Südhof (1999) im Bulbus olfactorius, im Tuberculum olfactorium, im Nucleus accumbens, im CPU, im GP, in der SN und im ventralen tegmentalen Areal. Bemerkenswert ist, dass diese Arbeitsgruppe zwar einen hohen Gehalt an SV2C im Striatum feststellen konnte, Doppelmarkierungen gegen SV2C und parvalbuminpositive, Neuropeptid-Y-exprimierende nitriergende Interneurone und Calretinin-positive Interneurone jedoch keine Anfärbung gegen SV2C ergab. Dennoch wurde eine Expression von SV2C in cholinergen Interneuronen registriert und zwar in 45 % aller ChAT-positiven Zellen des Striatums. In der SN und im ventralen tegmentalen Areal sollen 70% der dopaminergen Neurone SV2C-positiv gewesen sein. Bekanntlich projizieren die Neurone der SN in das Striatum und das Auffinden von TH-positiven BiVs nach intrastriatale BoNT-A-Behandlung durch uns könnte sich dadurch erklären lassen, dass die dopaminergen Afferenzen aus der SN im Striatum ebenfalls mit SV2C besetzt sind und damit über einen Rezeptor für BoNT-A verfügen.

Ebenfalls berichten die Autoren, dass GABAerge Interneurone kaum bzw. weniger SV2C als cholinerge Interneurone exprimieren. Wenn die Expression von SV2C notwendig ist, damit BoNT-A wirksam werden kann, so erklärt dies, warum wir in der immunhistochemischen GAD67-Färbung keine Veränderung GABAerge Strukturen beobachten konnten. Im

Tuberculum olfactorium, in dem nach Dardou et al. (2011) SV2-C exprimiert wird, und im piriformen Kortex, der Afferenzen aus dem Bulbus olfactorius erhält, und in dem wiederum laut Janz und Südhof (1999) ebenfalls SV2-C-exprimierende Neurone vorkommen, konnten wir sowohl TH-positive als auch ChAT-positive BiVs auffinden.

Es ist also denkbar, dass BoNT-A bei intrastriatarer Injektion auf keine weiteren Teile des Telencephalons einwirken kann, da anderen Regionen der Gehirne von Wistar Ratten der entsprechende SV2-Subtypus als Rezeptor und Andockstelle für BoNT-A fehlt. Aus diesem Grund sind in keinem weiteren Hirnareal von BoNT-A-behandelten Ratten BiVs aufzufinden. Unklar ist, ob das BoNT-A über Diffusion vom Striatum in den piriformen Kortex gelangt ist und dort die Ausbildung von BiVs induzieren konnte oder ob es durch axonale Transportvorgänge dort hin gelangt ist. Es ist bekannt, dass BoNTs axonal transportiert werden können, wie z. B. durch Antonucci et al. (2008) für BoNT-A bewiesen wurde, und dass der piriformer Kortex mit dem Striatum zumindest indirekt über die Amygdala in Verbindung steht (Krettek und Price, 1978a, b; Schwabe et al., 2004). Die Möglichkeit eines axonalen Transports von BoNT-A in den piriformen Kortex ist also durchaus gegeben. Andere Hirnareale, die teilweise den Injektionsstellen näher lagen und ebenfalls mit dem Striatum afferent oder efferent verbunden sind, wie Pallidum, Kortex, Thalamus und SN, bildeten keine BiVs aus. Sie verfügen evtl. über einen anderen Besatz an SV2-Subtypen an den dortigen Axonendigungen, was durch entsprechende histochemische Untersuchungen nachzuprüfen wäre.

4.7. Therapeutisches Potential der intrastriatalen BoNT-A-Applikation

In dieser Arbeit konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass die Infusion des CPU mit einer BoNT-A Lösung einen therapeutischen Effekt haben kann. Die Ergebnisse der apomorphininduzierten Rotationstests und des Zylindertests lassen diese Vermutung zu, müssen jedoch durch die Rezeptorautoradiografie und durch Versuche an Primaten bestätigt werden. Dennoch wäre durch eine solche Behandlung keinesfalls das gesamte Symptomspektrum des MP therapeutisch abgedeckt, lediglich das Ausmaß der Akinese würde hierdurch verringert werden. Durch die Ergebnisse der Verhaltenstests ist es denkbar, dass auch depressive Störungen und pathologische Ängstlichkeit die mit MP oft einhergehen positiv beeinflusst werden.

Der Tremor der distalen Extremitäten, der aber ebenfalls sehr oft mit MP einhergeht, scheint zu einem großen Teil auf eine Störung der Funktionalität des Pallidums zurückzuführen zu sein (Helmich et al., 2011), was zu einer Beeinträchtigung der cerebellothalamischen

Verschaltung führt. Zwar ist das Pallidum afferent mit dem Striatum gekoppelt, doch können noch keine Aussagen darüber getroffen werden, inwiefern eine intrastriatale BoNT-A-Behandlung auch den Tremor vermindert.

Da es sich bei der Injektion von BoNT-A in das Striatum um eine rein symptomatische Behandlungsmethode handelt und das IPS fortschreitend verläuft und in späten Stadien zu neuronalem Untergang im Kortex führt, ist das Problem der Demenz und der Wesensveränderung, die mit PD einhergeht, durch eine BoNT-A-Applikation nicht gelöst.

4.8. Ausblick

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass nach intrastriataler BoNT-A-Behandlung von Hemiparkinsonratten ein pathologisches apomorphininduziertes Rotationsverhalten vollständig zurückgeht. Die Ergebnisse des Zylindertestes deuten darauf hin, dass auch das spontane motorische Verhalten bei läsionierten Tieren verbessert wird. Kognitive Fähigkeiten werden durch eine solche Behandlung nicht nennenswert beeinträchtigt. Die Testung des spontanen Erkundungs- und Angstverhaltens lässt den Schluss zu, dass auch Depressionen und Angststörungen, die mit der Parkinsonschen Erkrankung einhergehen können durch die intrastriatale Injektion von BoNT-A ebenfalls positiv beeinflusst werden.

Da von einigen Autoren Water-Maze-Beckendurchmesser von 2 m für Mäuse empfohlen werden, scheint eine Wiederholung dieses Testes mit einem größeren Versuchsbecken erforderlich. Eine Testung des instrumentellen und habituellen Lernens sollte die bisher durchgeführten Kognitionstests ergänzen.

Das Ausbleiben von apomorphininduzierten Rotationen bei heimläsionierten Ratten nach BoNT-A-Behandlung und das späte Auftreten einer Angleichung von linksseitigem und rechtsseitigem spontanen Vorderpfotengebrauch machen es wahrscheinlich, dass indirekte Effekte der BoNT-A-Behandlung für diese motorischen Verhaltensänderungen ursächlich sein können. Eine Änderung des Rezeptorbesatzes von Striatum, Pallidum, STN, Thalamus und/ oder Motorkortex erscheint hierbei denkbar. Eine mögliche Detektion einer hirnearealspezifischen Rezeptordichteänderung lässt sich exzellent mit der Rezeptorautoradiografie realisieren. Prinzip dieser Methode ist es, einen radioaktiv markierten Liganden eines Rezeptors auf histologische Schnitte von Nervengewebe einwirken zu lassen und durch Belichtung von Filmfolien die Dichte der Rezeptoren in den einzelnen Gehirngebieten zu bestimmen. Um schlüssige Erklärungen für unsere teils divergierenden Ergebnisse zu erlangen ist es notwendig, die Gehirne verschiedener Versuchstiergruppen (nur

Diskussion

BoNT-A-behandelt, 6-OHDA-läsioniert bzw. schein-6-OHDA-läsioniert und BoNT-A-behandelt, schein-behandelt und unbehandelt) mit dieser Methode zu untersuchen.

Bezüglich der BiVs wird geklärt, ob die Varikositäten von einem Stau synaptischer Vesikel herrühren, deren Ausschüttung durch den gestörten Vesikelfusionsapparat nicht mehr möglich ist und inwieweit zytoskeletale Bestandteile gestört sind. Um einen eventuellen neurodegenerativen Prozess, der mit Akkumulation von Amyloid- β in BoNT-A-behandelten Gehirnen einhergeht, zu detektieren, werden künftig Färbungen gegen Amyloid- β durchgeführt (Johnson et al., 2010; Medana und Esiri, 2003).

Mittels immunhistochemischer Färbungen gegen BoNT-A-gespaltenes SNAP-25 an Gehirnschnitten von Ratten, die verschieden lange nach BoNT-A-Injektion überlebt haben, soll eruiert werden, wie lange und in welchem Radius um die Injektionsstelle herum BoNT-A im Striatum tatsächlich wirksam bleibt und SNAP-25 spaltet.

Für die endgültige Beweisführung, dass es im Striatum nach BoNT-A-Behandlung tatsächlich zu einer Reduzierung des extrazellulären Acetylcholingehaltes kommt, sollen *in vivo* Untersuchungen der Striata mittels Mikrodialyse und Hochdrucksäulenchromatographie durchgeführt werden.

Eine andere, einfachere, aber dennoch aussagekräftige Methode bestünde in der Applikation eines Blut-Hirn-Schranken-gängigen Acetylcholinesteraseblockers. Mit ihm ließe sich der, nach submaximaler BoNT-A-Gabe verminderte Acetylcholingehalt im CPU wieder erhöhen. Das müsste auch die apomorphininduzierte Rotationsrate wieder erhöhen, den BoNT-A-Effekt also partiell aufheben. Damit wäre ein cholinerges Mechanismus der Rotationsunterdrückung bewiesen. Dass in Striata, die mit 1 ng BoNT-A behandelt wurden, noch eine gewisse Menge Acetylcholin ausgeschüttet wird, ergibt sich daraus, dass die Rotationsabnahme in hemiläsionierten Tieren nach Behandlung mit 2 ng noch stärker ausfällt. Donepezil, ein bekanntes Alzheimermedikament beim Menschen, erwies sich in Vorexperimenten als ein ZNS-gängiger Acetylcholinesteraseblocker, der von Ratten exzellent vertragen wird. In Hemiparkinson-Tieren, deren anfänglich hohe apomorphininduzierte Rotationsrate durch unilaterale intrastriatale BoNT-A-Gabe aufgehoben war, stieg diese nach Donepezilverabreichung wieder an. Diese Experimente werden derzeit mit höheren Versuchstierzahlen wiederholt.

Mittel- und langfristig ist die Testung der intrastriatalen BoNT-A-Behandlung auch in genetisch veränderten Mäuselinien, die spontan ein parkinsonähnliches Syndrom aufgrund fortschreitender Neurodegeneration und α -Synucleinüberexpression ausbilden, vorgesehen. Daran sollte sich eine Testung im Primatenmodell des MP anschließen.

5. Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Wree für die Vergabe dieses Promotionsthemas sowie für die Bereitstellung aller Arbeitsmaterialien und vor Allem für die wissenschaftliche Freiheit danken. Sein außerordentliches Engagement in der Betreuung und fachlichen Beratung waren mir eine nicht hoch genug zu würdigende Hilfe. Als dann gilt mein Dank Dr. Mix der stets für fachliche Diskussionen und hilfreiche Ratschläge zur Verfügung stand. Ebenfalls danke ich Prof. Weiss für die Betreuung meiner Arbeit und für reichlich gute Tipps.

Auch Herrn Prof. Benecke gilt besonderer Dank für seine Unterstützung in allen Fragen zu Botulinum Neurotoxin A.

Prof. Schmitt danke ich für seine zahlreichen Mühen, die er sich im Rahmen der Stereologie und deren Auswertung gemacht hat.

Herrn Prof. Witt, Frau Dr. Antipova, Herrn Dr. Holzmann und Frau Dräger möchte ich für ihre Hilfe und vor Allem die angenehme Arbeitsatmosphäre während der gemeinsamen Arbeit in diesem Projekt danken.

Meinem Kollegen Dr. Stefan Jean Pierre Haas danke ich für zahlreiche kritische und fruchtbare Diskussionen und Anregungen.

Den technischen Assistentinnen Frau Winzer, Schühmann, Lehmann, Meyer und Kuhnke danke ich für ihre gründliche und vorbildliche Arbeit.

6. Literaturverzeichnis

- Angot E, Brundin P (2009) Dissecting the potential molecular mechanisms underlying alpha-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 15 Suppl 3: 143-147.
- Angot E, Steiner JA, Hansen C, Li JY, Brundin P (2010) Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol*, 9: 1128-1138.
- Ando S, Kobayashi S, Waki H, Kon K, Fukui F, Tadenuma T, Iwamoto M, Takeda Y, Izumiyama N, Watanabe K, Nakamura H (2002) Animal model of dementia induced by entorhinal synaptic damage and partial restoration of cognitive deficits by BDNF and carnitine. *J Neurosci Res*, 70(3): 519-527.
- Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M (2008) Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci*, 28(14): 3689-3696.
- Ashton AC, Dolly JO (1988) Characterization of the inhibitory action of botulinum neurotoxin type A on the release of several transmitters from rat cerebrocortical synaptosomes. *J Neurochem*, 50(6): 1808-1816.
- Bajjalieh SM, Peterson K, Shinghal R, Scheller RH (1992) SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. *Science*, 257(5074): 1271-1273.
- Bajjalieh SM, Peterson K, Linial M, Scheller RH (1993) Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(6): 2150-2154.
- Baumann L, Slezinger A, Halem M, Vujevich J, Mallin K, Charles C, Martin LK, Black L, Bryde J (2005) Double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of the safety and efficacy of Myobloc (botulinum toxin type B) for the treatment of palmar hyperhidrosis. *Dermatol Surg*, 3: 263-270.
- Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP (2010) The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 23(4): 228-242.
- Benecke R, Hagenah R, Wiegand H (1975) Effects of type A botulinum toxin on some synaptic transmissions in the spinal cord of cats. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 359(Suppl.1), R90.
- Berliocchi L, Fava E, Leist M, Horvat V, Dinsdale D, Read D, Nicotera P (2005) Botulinum neurotoxin C initiates two different programs for neurite degeneration and neuronal apoptosis. *J Cell Biol*, 168: 607-618.
- Bigalke H, Dreyer F, Bergey G (1985) Botulinum A neurotoxin inhibits non-cholinergic synaptic transmission in mouse spinal cord neurons in culture. *Brain Res*, 360(1-2): 318-324.
- Birkmayer W, Danielczyk W (1991) *Die Parkinson-Krankheit*. 5. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart-New York.
- Bogo V, Hill TA, Young RW (1981) Comparison of accelerod and rotarod sensitivity in detecting ethanol- and acrylamide-induced performance decrement in rats: review of experimental considerations of rotating rod systems. *Neurotoxicology*, 2(4): 765-787.
- Bohnen NI, Albin RL (2011) The cholinergic system and Parkinson disease. *Behav Brain Res*, 221(2): 564-573.
- Bozzi Y, Costantin L, Antonucci F, Caleo M (2006) Action of botulinum neurotoxins in the central nervous system: antiepileptic effects. *Neurotox Res*, 9(2-3): 197-203.
- Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K (2003) Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm*, 110: 517-536.
- Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24: 197-211.

Literaturverzeichnis

- Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke Hansjürgen, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related Pathology. *Cell Tissue Res*, 318: 121-134.
- Braak H, Bohl JR, Müller CM, Rüb U, de Vos RA, Del Tredici K (2006) Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord*, 21(12): 2042-2051.
- Braak H, Del Tredici K (2008) Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology*, 70(20): 1916-1925.
- Brunger AT, Rongsheng J, Breidenbach MA (2009) In: Botulinum toxin. Therapeutic clinical practice and science; Jankovic, J., Albanese, A., Atassi, M.Z., Dolly, J.O., Hallett, M., Mayer, N.H., Eds.; Saunders Elsevier; Philadelphia, pp. 41-52.
- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, 329(5999): 1663-1667.
- Campbell N, Boustani M, Limbil T, Ott C, Fox C, Maidment I, Schubert CC, Munger S, Fick D, Miller D, Gulati R (2009) The cognitive impact of anticholinergics: a clinical review. *Clin Interv Aging*, 4: 225-233.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, 180(4596): 1200.
- Carmichael KP, Howerth EW, Oliver JE Jr, Klappenbach K (1993) Neuroaxonal dystrophy in a group of related cats. *J Vet Diagn Invest*, 5(4): 585-590.
- Chancellor MB, Fowler CJ, Apostolidis A, de Groat WC, Smith CP, Somogyi GT, Aoki KR (2008) Drug Insight: biological effects of botulinum toxin A in the lower urinary tract. *Nat Clin Pract Urol*, 5: 319-328.
- Chang WP, Südhof TC (2009) SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca²⁺-induced exocytosis. *J Neurosci*, 29(4): 883-897.
- Chung KK, Dawson VL, Dawson TM (2001) The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, 24: 7-14.
- Clarke CE (2002) Medical management of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72 Suppl 1:122-127.
- Coffield JA, Considine RV, Simpson LL (1994) Clostridial neurotoxins in the age of molecular medicine. *Trends Microbiol*, 2(3): 67-72.
- Coffield JA, Yan X (2009) Neuritogenic actions of botulinum neurotoxin A on cultured motor neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 330(1): 352-358.
- Cohen AD, Tillerson JL, Smith AD, Schallert T, Zigmond MJ (2003) Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. *J Neurochem*, 85(2): 299-305.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219(4589): 1184-1190.
- Connor B, Kozlowski DA, Schallert T, Tillerson JL, Davidson BL, Bohn MC (1999) Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the striatum and substantia nigra of the aged Parkinsonian rat. *Gene Ther*, 6(12): 1936-1951.
- Couesnon A, Shimizu T, Popoff MR (2009) Differential entry of botulinum neurotoxin A into neuronal and intestinal cells. *Cell Microbiol*, 11(2): 289-308.
- Critchley EM (1991) A comparison of human and animal botulism: a review. *J R Soc Med*, 84(5): 295-298.

Literaturverzeichnis

- Crowder KM, Gunther JM, Jones TA, Hale BD, Zhang HZ, Peterson MR, Scheller RH, Chavkin C, Bajjalieh SM (1999) Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26): 15268-15273.
- Cruz AP, Frei F, Graeff FG (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 49(1):171-176.
- Cuénod M, Sandri C, Akert K (1970) Enlarged synaptic vesicles as an early sign of secondary degeneration in the optic nerve terminals of the pigeon. *J Cell Sci*, 6(2): 605-613.
- Day J, Damsma G, Fibiger HC (1991) Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *PharmacolBiochemBehav*, 38(4):723-729.
- Dardou D, Dassel D, Cuvelier L, Deprez T, De Ryck M, Schiffmann SN (2011) Distribution of SV2C mRNA and protein expression in the mouse brain with a particular emphasis on the basal ganglia system. *Brain Res*, 130-145.
- Dassinger M, Grohmann I, Jung B, Kuhlmann A, Löwe M, Pflieger A, Schwinn A, Selz C, Sy K (2011) Rote Liste 2011. Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt am Main, 1441, 1899-1900.
- De Leonibus E, Costantini VJ, Massaro A, Mandolesi G, Vanni V, Luvisetto S, Pavone F, Oliverio A, Mele A (2011) Cognitive and neural determinants of response strategy in the dual-solution plus-maze task. *Learn Mem*, 18(4): 241-244.
- de Rijk M C, Tzourio C, Breteler M M, Dartigues J F, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran J M, Alperovitch A, Rocca WA (1997). Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*, 62: 10-15.
- Denenberg VH. Open-field behavior in the rat: what does it mean? *AnnNYAcadSci* 1969;159(3): 852-859.
- Dolly, J.O.; Meng, J.; Wang, J.; Lawrence, G.W.; Bodeker, M.; Zurawski, T.H.; Sasse, A. (2009) In: Botulinum toxin. Therapeutic clinical practice and science; Jankovic, J., Albanese, A., Atassi, M.Z., Dolly, J.O., Hallett, M., Mayer, N.H., Eds.; Saunders Elsevier; Philadelphia, pp. 1-14.
- Dong M, Richards DA, Goodnough MC, Tepp WH, Johnson EA, Chapman ER (2003) Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol*, 162(7): 1293-1303.
- Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, Chapman ER (2006) SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science*, 312(5773): 592-596.
- Doralp S, Leung LS (2008) Cholinergic modulation of hippocampal CA1 basal-dendritic long-term potentiation. *Neurobiol Learn Mem*, 90: 382-388.
- Doty RL, Bromley SM, Stern MB (1995) Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. *Neurodegeneration*, 4(1): 93-97.
- Drenckhahn D (1977) Axonal and cellular alterations in the inner ear of rats treated with chlorphentermine or iprindole. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 23(1): 87-92.
- Duvoisin RC (1967) Cholinergic-anticholinergic antagonism in parkinsonism. *Arch Neurol*, 17(2): 124-136.
- Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, Starr P, Larson P, Bankiewicz KS, Aminoff MJ (2008) Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*, 70(21): 1980-1983.
- Emre M, Aarsland D, Albanese A, Byrne EJ, Deuschl G, De Deyn PP, Durif F, Kulisevsky J, van Laar T, Lees A, Poewe W, Robillard A, Rosa MM, Wolters E, Quarg P, Tekin S, Lane R (2004) Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease. (2004) *N Engl J Med*, 351(24): 2509-2518.
- Ertürk A, Hellal F, Enes J, Bradke F (2007) Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *J Neurosci*, 27(34): 9169-9180.

Literaturverzeichnis

- Feany MB, Lee S, Edwards RH, Buckley KM (1992) The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell*, 70(5): 861-867.
- Feldman ML, Peters A (1998) Ballooning of myelin sheaths in normally aged macaques. *J Neurocytol* , 27(8):605-614.
- Fernandes C, File SE (1996) The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 54(1): 31-40.
- Ferrer I (2011) Neuropathology and neurochemistry of nonmotor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, 17;2011:708404.
- File SE (1987) The contribution of behavioural studies to the neuropharmacology of anxiety. *Neuropharmacology*, 26(7B): 877-886.
- First M, Gil-Ad I, Taler M, Tarasenko I, Novak N, Weizman A (2011) The Effects of Fluoxetine Treatment in a Chronic Mild Stress Rat Model on Depression-Related Behavior, Brain Neurotrophins and ERK Expression. *J Mol Neurosci*
- Fischer A, Mushrush DJ, Lacy DB, Montal M (2008) Botulinum neurotoxin devoid of receptor binding domain translocates active protease. *PLoS Pathog*, 4(12):e1000245.
- Fortin GD, Desrosiers CC, Yamaguchi N, Trudeau LE (2006) Basal somatodendritic dopamine release requires snare proteins. *J Neurochem*, 96(6): 1740-1749.
- Frost B, Diamond MI (2010) Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 11: 155-159.
- Fujita M, Sugama S, Sekiyama K, Sekigawa A, Tsukui T, Nakai M, Waragai M, Takenouchi T, Takamatsu Y, Wei J, Rockenstein E, Laspada AR, Masliah E, Inoue S, Hashimoto M (2010) A β -synuclein mutation linked to dementia produces neurodegeneration when expressed in mouse brain. *Nat Commun*, 1:110.
- Garthe A, Behr J, Kempermann G (2009) Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One*, 4(5):e5464. Epub 2009 Mai 7.
- Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, Graham DI, Thompson CJ, Marcincin RP (1982) Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Ann Neurol*, 12(6): 564-574.
- Gerfen CR, Keefe KA, Gauda EB (1995) D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci*, 15: 8167-8176.
- Gerlach M, Reichmann H, Riederer P (Hrsg.) (2003) *Die Parkinson-Krankheit*. 3. Auflage, Springer, Wien.
- Hawkes CH, Shephard BC (1998) Olfactory evoked responses and identification tests in neurological disease. *Ann N Y Acad Sci*, 855: 608-615.
- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2007) Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 33: 599-614.
- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2009) Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Ann N Y Acad Sci*, 1170: 615-622.
- Hawlotschka A, Antipova A, Schmitt O, Witt M, Benecke R, Mix E, Wree A (2011) Intracerebrally Applied Botulinum Neurotoxin in Experimental Neuroscience. *Curr Pharm Biotechnol*, in Press
- Heckmann M, Breit S, Ceballos-Baumann A, Schaller M, Plewig G (1999) Side-controlled intradermal injection of botulinum toxin A in recalcitrant axillary hyperhidrosis. *J Am Acad Dermatol*, 4: 987-990.

Literaturverzeichnis

- Heckmann M, Plewig G; Hyperhidrosis Study Group (2005) Low-dose efficacy of botulinum toxin A for axillary hyperhidrosis: a randomized, side-by-side, open-label study. *Arch Dermatol*, 141: 1255-1259.
- Helmich RC, Janssen MJ, Oyen WJ, Bloem BR, Toni I (2011) Pallidal dysfunction drives a cerebellothalamic circuit into Parkinson tremor. *Ann Neurol*, 69: 269-281
- Hisahara S, Shimohama S (2011) Toxin-induced and genetic animal models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2011 Dec 22;2011:951709.
- Holscher C, Schmidt WJ (1994) Quinolinic acid lesion of the rat entorhinal cortex pars medialis produces selective amnesia in allocentric working memory (WM), but not in egocentric WM. *Behav Brain Res*, 63(2): 187-194.
- von Hörsten S, Schmitt I, Nguyen HP, Holzmann C, Schmidt T, Walther T, Bader M, Pabst R, Kobbe P, Krotova J, Stiller D, Kask A, Vaarmann A, Rathke-Hartlieb S, Schulz JB, Grasshoff U, Bauer I, Vieira-Saecker AM, Paul M, Jones L, Lindenberg KS, Landwehrmeyer B, Bauer A, Li XJ, Riess O (2003) Transgenic rat model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 12(6): 617-624.
- Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B (2000) How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie*, 82(5): 427-446.
- Ishida H, Zhang X, Erickson K, Ray P (2004) Botulinum toxin type A targets RhoB to inhibit lysophosphatidic acid-stimulated actin reorganization and acetylcholine release in nerve growth factor-treated PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 310: 881-889.
- Jahn R (2006) Neuroscience. A neuronal receptor for botulinum toxin. *Science*, 312(5773): 540-541.
- Janz R, Goda Y, Geppert M, Missler M, Südhof TC (1999) SV2A and SV2B function as redundant Ca²⁺ regulators in neurotransmitter release. *Neuron*, 24(4): 1003-1016.
- Janz R, Südhof TC (1999) SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience*, 94(4): 1279-1290.
- Jarraya B, Boulet S, Ralph GS, Jan C, Bonvento G, Azzouz M, Miskin JE, Shin M, Delzescaux T, Drouot X, Hérard AS, Day DM, Brouillet E, Kingsman SM, Hantraye P, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Palfi S. (2009) Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Sci Transl Med*. 1(2): 2ra4.
- Johnson VE, Stewart W, Smith DH (2010) Traumatic brain injury and amyloid- β pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nat Rev Neurosci*, 11(5): 361-370.
- Jones BJ, Roberts DJ (1968) The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol*, 20(4): 302-304.
- Kahlig KM, Binda F, Khoshbouei H, Blakely RD, McMahon DG, Javitch JA, Galli A. (2005) Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(9): 3495-3500.
- Karachi C, Grabli D, Bernard FA, Tandé D, Wattiez N, Belaid H, Bardinet E, Prigent A, Nothacker HP, Hunot S, Hartmann A, Lehericy S, Hirsch EC, François C (2010) Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. *J Clin Invest*, 120(8): 2745-2754.
- Karnovsky MJ, Roots L (1964) A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem*, 12: 219-221.
- Krettek JE, Price JL (1978 a) Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol*, 178(2): 225-254.
- Krettek JE, Price JL (1978 b) A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol*, 178(2): 255-280.

Literaturverzeichnis

- Lacković Z, Rebić V, Riederer PF (2009) Single intracerebroventricular injection of botulinum toxin type A produces slow onset and long-term memory impairment in rats. *J Neural Transm*, 116(10): 1273-1280.
- Laing TA, Laing ME, O'Sullivan ST (2008) Botulinum toxin for treatment of glandular hypersecretory disorders. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 61: 1024-1028.
- Langston JW (2006) The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol*, 59(4): 591-596.
- Lazzell DR, Belizaire R, Thakur P, Sherry DM, Janz R (2004) SV2B regulates synaptotagmin 1 by direct interaction. *J Biol Chem*, 279(50): 52124-52131.
- Lebouvier T, Chaumette T, Paillusson S, Duyckaerts C, Bruley des Varannes S, Neunlist M, Derkinderen P (2009) The second brain and Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, 30(5): 735-741.
- LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, Kostyk SK, Thomas K, Sarkar A, Siddiqui MS, Tatter SB, Schwalb JM, Poston KL, Henderson JM, Kurlan RM, Richard IH, Van Meter L, Sapan CV, Doring MJ, Kaplitt MG, Feigin A (2011) AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol*, 10(4): 309-319.
- Lo Bianco C, Schneider BL, Bauer M, Sajadi A, Brice A, Iwatsubo T, Aebischer P (2004) Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, (50):17510-17515.
- Lozano AM, Lang AE, Hutchison WD, Dostrovsky JO (1998) New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and in its treatment. *Curr Opin Neurobiol*, 8(6): 783-790.
- Lu SY, Giordano M, Norman AB, Shipley MT, Sanberg PR (1990) Behavioral effects of neural transplants into the intact striatum. *PharmacolBiochemBehav*, 37(1): 135-148.
- Lu SY, Shipley MT, Norman AB, Sanberg PR (1991) Striatal, ventral mesencephalic and cortical transplants into the intact rat striatum: a neuroanatomical study. *Exp Neurol*, 113(2): 109-130.
- Luisetto S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F (2003) Toxicity of botulinum neurotoxins in central nervous system of mice. *Toxicon*, 41(4): 475-481.
- Luisetto S, Marinelli S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F (2004) Central injection of botulinum neurotoxins: behavioural effects in mice. *Behav Pharmacol*, 15(3): 233-240.
- Luisetto S, Marinelli S, Lucchetti F, Marchi F, Cobiauchi S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F (2006) Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: central vs. peripheral effects in mice. *Brain Res*, 1082(1): 124-131.
- Mahrhold S, Rummel A, Bigalke H, Davletov B, Binz T (2006) The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett*, 580(8): 2011-2014.
- Margraf NG, Wrede A, Rohr A, Schulz-Schaeffer WJ, Raethjen J, Eymess A, Volkmann J, Mehdorn MH, Jansen O, Deuschl G (2010) Camptocormia in idiopathic Parkinson's disease: a focal myopathy of the paravertebral muscles. *Mov Disord*, 25(5): 542-551.
- Marks WJ Jr, Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, Taylor R, Cahn-Weiner DA, Stoessl AJ, Olanow CW, Bartus RT (2008) Safety and tolerability of intraputaminial delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol*, 7(5): 400-408.
- Marmarou CR, Walker SA, Davis CL, Povlishock JT (2005) Quantitative analysis of the relationship between intra- axonal neurofilament compaction and impaired axonal transport following diffuse traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 22(10): 1066-1080.
- Marsden CD (1992) Parkinson's disease. *Postgrad Med J*, 68(801): 538-543.

Literaturverzeichnis

- Medana IM, Esiri MM (2003) Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain*, 126(Pt 3): 515-530.
- Meissner WG, Frasier M, Gasser T, Goetz CG, Lozano A, Piccini P, Obeso JA, Rascol O, Schapira A, Voon V, Weiner DM, Tison F, Bezard E. (2011) Priorities in Parkinson's disease research. *Nat Rev Drug Discov*, 10(5): 377-393.
- Mizutani T, Kasahara M (1997) Hippocampal atrophy secondary to entorhinal cortical degeneration in Alzheimer-type dementia. *Neurosci Lett*, 222(2):119-122.
- Montecucco C, Schiavo G. (1995) Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q Rev Biophys*, 28: 423-472.
- Montgomery KC, Monkman JA. (1955) The relation between fear and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 48(2): 132-136.
- Morris R, Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. (1984) *J Neurosci Methods*, 11(1): 47-60.
- Morrison JH, Hof PR (1997) Life and death of neurons in the aging brain. *Science*, 278(5337): 412-419.
- Müller A, Müngersdorf M, Reichmann H, Strehle G, Hummel T (2002) Olfactory function in Parkinsonian syndromes. *J Clin Neurosci*, 9(5): 521-524.
- Naumann M, Hofmann U, Bergmann I, Hamm H, Toyka KV, Reiners K. (1998) Focal Hyperhidrosis: effective treatment with intracutaneous botulinum toxin. *Arch Dermatol*, 134: 301-304.
- Nguyen HP, Kobbe P, Rahne H, Wörpel T, Jäger B, Stephan M, Pabst R, Holzmann C, Riess O, Korr H, Kántor O, Petrasch-Parwez E, Wetzel R, Osmand A, von Hörsten S (2006) Behavioral abnormalities precede neuropathological markers in rats transgenic for Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 15(21): 3177-3194.
- Nishiki T, Kamata Y, Nemoto Y, Omori A, Ito T, Takahashi M, Kozaki S (1994) Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem*, 269(14): 10498-10503.
- Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, Sato K, Sekiguchi M, Takahashi M, Kozaki S (1996 a) The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett*, 378(3): 253-257.
- Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, Sekiguchi M, Takahashi M, Kozaki S (1996 b) Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin II cDNA. *Neurosci Lett*, 208(2): 105-108.
- Obeso JA, Marin C, Rodríguez-Oroz C, Blesa J, Benitez-Temiño B, Mena-Segovia J, Rodríguez M, Olanow CW (2008 a) The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. *Ann Neurol*, 64 Suppl 2: 30-46.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodríguez M (2008 b) Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23 Suppl 3: 548-559.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodríguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, Halliday G (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*, 16: 653-661.
- Oh YS, Kim JS, Chung SW, Kim YD, Lee KS (2011) Camptocormia: as the first sign of Parkinson's disease. *Can J Neurol*, 38(2): 370-372.

Literaturverzeichnis

- Olanow CW, Obeso JA (2011) Levodopa toxicity and Parkinson disease: Still a need for equipoise. *Neurology*, 77(15): 1416-1417.
- Olanow CW, Prusiner SB (2009) Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(31):12571-12572.
- Pahwa R (2006) Understanding Parkinson's disease: an update on current diagnostic and treatment strategies. *J Am Med Dir Assoc*, 7(7 Suppl 2): 4-10.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. 4. ed, Academic Press
- Pearce LB, First ER, MacCallum RD, Gupta A (1997) Pharmacologic characterization of botulinum toxin for basic science and medicine. *Toxicon*, 35(9): 1373-1412.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14(3): 149-167.
- Peress NS, Kim BK (1974) Profound muscle weakness associated with axis cylinder ballooning. A case report. *Acta Neuropathol*, 28: 87-92
- Pisani A, Bernardi G, Ding J, Surmeier DJ (2007) Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci*, 30(10): 545-553.
- Playfer JR (1997) Parkinson's disease. *Postgrad Med J*, 73(859): 257-264.
- Poewe W (2008) Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, 15 Suppl 1: 14-20.
- Potashkin JA, Blume SR, Runkle NK (2011) Limitations of animal models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2010 Dec 20;2011: 658083.
- Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC (2001) Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 58(9): 1395-1402.
- Reid SM, Johnstone BR, Westbury C, Rawicki B, Reddihough DS (2008) Randomized trial of botulinum toxin injections into the salivary glands to reduce drooling in children with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol*, 50: 123-128.
- Ries V, Depboylu C, Arias-Carrion O, Oertel WH, Höglinger GU (2008) M. Parkinson - Zukünftige Therapieoptionen aus der Grundlagenforschung. *Neuroforum*, 3: 234-241.
- Rockenstein E, Ubhi K, Pham E, Michael S, Doppler E, Novak P, Inglis C, Mante M, Adame A, Alvarez XA, Moessler H, Masliah E (2011) Beneficial effects of a neurotrophic peptidergic mixture persist for a prolonged period following treatment interruption in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 89(11): 1812-1821.
- Rohkamm R (2000) *Taschenatlas Neurologie*. Thieme Verlag, Stuttgart-New York.
- Rummel A, Karnath T, Henke T, Bigalke H, Binz T (2004) Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem*, 279(29): 30865-30870.
- Rummel A, Eichner T, Weil T, Karnath T, Gutcaits A, Mahrhold S, Sandhoff K, Proia RL, Acharya KR, Bigalke H, Binz T (2007) Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(1): 359-364.
- Schallert T, Lindner MD. (1990) Rescuing neurons from trans-synaptic degeneration after brain damage: helpful, harmful, or neutral in recovery of function? *Can J Psychol*, 44(2): 276-292.
- Schallert T, Whishaw IQ, Ramirez VD, Teitelbaum P (1978) Compulsive, abnormal walking caused by anticholinergics in akinetic, 6-hydroxydopamine-treated rats. *Science*, 199(4336):1461-1463

Literaturverzeichnis

- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev*, 80(2): 717-766.
- Schivell AE, Batchelor RH, Bajjalieh SM (2006) Isoform-specific, calcium-regulated interaction of the synaptic vesicle proteins SV2 and synaptotagmin. *J Biol Chem*, 271(44): 27770-27775.
- Schwabe K, Ebert U, Löscher W (2004) The central piriform cortex: anatomical connections and anticonvulsant effect of GABA elevation in the kindling model. *Neuroscience*, 126(3): 727-741.
- Simpson DM, Blitzer A, Brashear A, Comella C, Dubinsky R, Hallett M, Jankovic J, Karp B, Ludlow CL, Miyasaki JM, Naumann M, So Y (2008) Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology Assessment: Botulinum neurotoxin for the treatment of movement disorders (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 70: 1699-1706.
- Stenmark P, Dupuy J, Imamura A, Kiso M, Stevens RC (2008) Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS Pathog*, 4(8): e1000129.
- Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol*, 75: 406-433.
- Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da CC, Takahashi RN (2008) Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 156(4): 830-840.
- Tago H, McGeer PL, McGeer EG (1987) Acetylcholinesterase fibers and the development of senile plaques. *Brain Res*, 406: 363-369.
- Tolosa E, Compta Y, Gaig C (2007) The premotor phase of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 13 Suppl: 2-7.
- Toovey S, Jick SS, Meier CR (2011) Parkinson's disease or Parkinson symptoms following seasonal influenza. *Influenza Other Respi Viruses*, 5(5): 328-333.
- Umemura A, Jaggi JL, Hurtig HI, Siderowf AD, Colcher A, Stern MB, Baltuch GH (2003) Deep brain stimulation for movement disorders: morbidity and mortality in 109 patients. *J Neurosurg*, 98(4): 779-784.
- Ungerstedt U, Butcher LL, Butcher SG, Andén NE, Fuxe K (1969) Direct chemical stimulation of dopaminergic mechanisms in the neostriatum of the rat. *Brain Res*, 14(2): 461-471.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*, 24(3): 485-493.
- Vadoud-Seyedi J (2004) Treatment of plantar hyperhidrosis with botulinum toxin type A. *Int J Dermatol*, 43: 969-971.
- Verderio C, Rossetto O, Grumelli C, Frassoni C, Montecucco C, Matteoli M (2006) Entering neurons: botulinum toxins and synaptic vesicle recycling. *EMBO Rep*, 7: 995-999.
- Vowles GH, Scholtz CL, Cameron JM (1987) Diffuse axonal injury in early infancy. *J Clin Pathol*, 40(2): 185-189.
- Wang HC, Duan ZX, Wu FF, Xie L, Zhang H, Ma YB (2010) A new rat model for diffuse axonal injury using a combination of linear acceleration and angular acceleration. *J Neurotrauma*, 27(4): 707-719.
- Weaver FM, Follett K, Stern M, Hur K, Harris C, Marks WJ Jr, Rothlind J, Sagher O, Reda D, Moy CS, Pahwa R, Burchiel K, Hogarth P, Lai EC, Duda JE, Holloway K, Samii A, Horn S, Bronstein J, Stoner G, Heemskerk J, Huang GD; CSP 468 Study Group. (2009) Bilateral deep brain stimulation vs best

Literaturverzeichnis

medical therapy for patients with advanced Parkinson disease: a randomized controlled trial. *JAMA*, 301(1): 63-73.

Whitney CM (2007) Medications for Parkinson's disease. *Neurologist*, 13(6): 387-388.

Williamson LC, Halpern JL, Montecucco C, Brown JE, Neale EA (1996) Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neurotoxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa. *J Biol Chem*, 271(13): 7694-7699.

Xu T, Bajjalieh SM (2001) SV2 modulates the size of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Nat Cell Biol*, 3(8): 691-698.

7. Anhang

7.1. Puffer/ Lösungen

20% Saccharoselösung

20 g handelsüblicher Zucker werden in 100 ml PBS (pH 7,4) gelöst.

Cacodylatpuffer (0,2 M, pH 7,2)

Es wurden 4,2806 g Natriumcacodylat in 100 ml Aqua dest gelöst, und der pH-Wert wurde anschließend mit Salzsäure auf 7,2 eingestellt.

Fluoreszenzeinbettmedium

60 ml Glycerol, 24 g Polyvenylalkohol (Molekulargewicht 30000 – 70000 g/mol) und 1 g Phenol wurden zusammen mit 60 ml Aqua dest und 120 ml TRIS-Puffer (0,2 M, pH 8,5) gelöst und anschließend filtriert.

Kryoprotektionslösung

126 ml Glycerol (85 %), 150 ml Ethylenglykol und 250 ml Phosphatpuffer (PBS, 0,1 M, pH 7,4) wurden gemischt.

PBS

Für 0,1 M salinen Phosphatpuffer, mit einem pH-Wert von 7,4 wurden in 1 Liter Aqua dest 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 0,27 g KH_2PO_4 gelöst und der pH-Wert mittels Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

Physiologische Kochsalzlösung/ 0,9% Natriumchloridlösung

Physiologische Kochsalzlösung wurde stets selbst frisch angesetzt. Neun Gramm Kochsalz wurden in einem Liter autoklaviertem Aqua dest gelöst.

TRIS-Puffer (0,2 M, pH 8,5)

24,23 g TRIS wurden in 1 Liter Aqua dest gelöst.

Zitrat puffer (0,1 M)

19,213 g Zitronensäure wurden in 1 Liter Aqua dest gelöst und der pH-Wert wurde mit NaOH angepasst.

7.2. Tabellenanhang

Tabelle 1A.: Geräte und Materialien

Geräte und Material	Hersteller/ Lieferant
24-Well- und 48-Well-Gewebekulturschalen Multidish	Greiner bio-one
Accelerod System	TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland
ACLAR® Film	Ted Pella, Redding, CA, USA
Cryostat Jung CM300	Leica, Bensheim/ Jung , Deutschland
Deckgläser Menzel Gläser 24 mm*60 mm	in vitro diagnostic/ Apothekencharge
digital ansteuerbarer Objektträgertisch, MT12	Heidenhain, Traunreut, Deutschland
digitale Kamera CX9000 für Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie	MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA
Festplattencamcorder GZ-MG255E	JVC, Japan
Hamilton-Mikroliterspritze	Carl Roth, Karlsruhe
Mikroskop BX 51	Olympus, Tokyo, Japan
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Thermo Scientific
Open-Field-Anordnung	TSE, Bad Homburg, Deutschland
Pinsel Junior Synthetics, Serie 303, Größe 1 und 2	da Vinci
Radial-Maze-Anordnung	TSE, Bad Homburg, Deutschland
Schüttler Standard Analog Shaker	VWR, Darmstadt
Stereotaxiegerät	David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA
Transmissionselektronenmikroskop EM 906	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Virtual Slide Scanner Mirax	Zeiss, Jena, Deutschland

Tabelle 2A.: Chemikalien, Biochemikalien und Kits

Chemikalien, Biochemikalien und Kits	Hersteller/ Lieferant
ABC Elite Kits Anti goat, Anti mouse, Anti sheep, standard (biotynlierter Sekundäntikörper, Avidin, Biotin)	Vector Laboratories, Camon, Wiesbaden, Deutschland
Acetylthiocholinjodid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammonium-nickelsulfat Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Amphetamin	
Apomorphin (Ampullen á 1ml bzw. 10 mg)	Teclapharm, Lüneburg, Deutschland
Botulinumtoxin-A	Quadragech Diagnostics
Cacodylat (Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DePeX	Serva, Heidelberg, Deutschland
Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Epon-812-Harz	Plano, Wetzlar, Deutschland
Ethopropazin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylenglykol 99%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formvar®	Plano, Wetzlar, Deutschland
Glycerol 85%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merk, Deutschland
Isopentan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin	bela-pharm, Vechta, Deutschland

Anhang

Kupfer-II-sulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Normal Rabbit Serum	Vector Laboratories, Southfield, MI, USA
Open-Field-Anordnung	TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polyvinylalkohol 87-90%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Propanol	Apothekencharge
Rinderserumalbumin Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose (handelsüblicher Zucker)	
Salzsäure (rauchend)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Freezing Medium®	Tissue Freezing Medium®
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Xylazin (Rompun®)	Bayer, Deutschland
Xylol	J T Baker, Greisheim, Deutschland
Zitronensäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3A.: Verwendete Software

Software	Hersteller/ Lieferant
Excel	Microsoft
Matlab	Mathworks
Steuer- und Auswerteprogramm StereoInvestigator, v8.0	MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA
VideoMot2 Software	TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland

Tabelle 4A.: Verwendete Primärantikörper für immunhistochemische Färbungen, sowie für Immunfluoreszenzfärbungen, deren Verdünnungen und Bezugsquellen

Primärantikörper(-antigen) (Spenderspezies)	Verdünnung	Bezugsquelle/ Hersteller	Epitop/ Zielstruktur
Bassoon (Kaninchen)	1:400	Synaptic Systems	Bassoon
ChAT (Ziege) polyclonal	1:200	Chemicon (Millipore)	Cholinacetyltransferase
GAD67 (Maus)	1:2000	Chemicon (Millipore)	GABAerg Neurone
GFAP (Ziege)	1:500	Sigma-Aldrich	Gliales Fibrilläres Saures Protein/ Astrocyten
Growth cone (Maus)	1:100	Acris Antibodies GmbH	Axonale Wachstumskegel
Iba-1 (Kaninchen)	1:250	Wako	Mikroglia
NeuN, clone A60 (Maus)	1:1000	Chemicon (Millipore)	Nervenzellen

Anhang

Neurofilament 200kD (Maus)	1:500	Linaris	Neurofilament
PACSIN 1 (Kaninchen)	1:300	Synaptic Systems	Pacsin1
Snap 25 (Maus)	1:200	Synaptic Systems	Snap25
Synapsin-1 (Kaninchen)	1:500	Sigma-Aldrich	Synapsin 1
Synaptophysin (Maus)	1:200	Sigma-Aldrich	Synaptophysin
Synaptotagmin 1 (Maus)	1:100	Synaptic Systems	Synaptotagmin 1
Syntaxin 1 (Maus)	1:200	Synaptic Systems	Syntaxin1
α -Synuclein	1:2000	BD-Biosciences	α -Synuclein
TH (Maus)	1:1000	Sigma-Aldrich	Tyrosinhydroxylase
TH (Schaf) polyclonal	1:1000	Chemicon (Millipore)	Tyrosinhydroxylase
β -Tubulin (Kaninchen)	1:100	Dianova	β -Tubulin
β -3-Tubulin (Maus)	1:1000	Chemicon (Millipore)	β -3-Tubulin
VAcHT (Kaninchen)	1:1000	Sigma-Aldrich	Vesikulärer Acetylcholintransporter
VMAT2 (Kaninchen)	1:100	Sigma-Aldrich	Vesikulärer Monamintransporter
ZnT3 (Kaninchen)	1:300	Synaptic Systems	Zink-Transporter 3

Tabelle 5A.: Verwendete Sekundärantikörper für immunhistochemische Färbungen, sowie für Immunfluoreszenzfärbungen, deren Verdünnungen und Bezugsquellen

Sekundärantikörper (Spenderspezies)	Bezugsquelle/ Hersteller	Verdünnung	Konjugat
Anti-Maus (Pferd)	Vector	1:67	Biotin
Anti-Maus (Esel) F(ab') ₂	Dianova	1:50	Cy2 bis-NHS ester

Anhang

Anti-Maus (Esel)	Dianova	1:50	Cy2 bis-NHS ester
Anti-Ziege (Kaninchen)	Vector	1:67	Biotin
Anti-Ziege (Esel)	Dianova	1:100	Cy3 bis-NHS ester
F(ab') ₂			
Anti-Ziege (Esel)	Dianova	1:100	Cy3 bis-NHS ester

Tabelle 6A.: Auflistung aller mittleren apomorphininduzierten Rotationswerte von Wistar-Ratten, denen nur BoNT-A bzw. dessen Vehikelsubstanz in das rechte CPU injiziert wurde

Zeitpunkt	100 pg	1 ng BoNT	2 ng BoNT	Schein-BoNT
2w nach BoNT-A-Injektion	0,28 ±0,62 n= 8	-1,69 ±1,29 n= 41	-1,78 ±2,47 n= 7	-0,06 ±0,47 n= 6
1m nach BoNT-A-Injektion		-0,67 ±1,21 N= 34		
2m nach BoNT-A-Injektion	0,45 ±0,56 n= 5	0,38 ±1,56 n= 27	-0,47 ±1,30 n= 5	-0,23 ±0,40 n= 6
3m nach BoNT-A-Injektion	0,92 ±0,65 n= 5	0,75 ±1,36 n= 27	0,62 ±0,96 n= 5	-0,14 ±0,68 n= 6
6m nach BoNT-A-Injektion		1,48 ±1,09 n= 20		
9m nach BoNT-A-Injektion		1,65 ±1,09 n= 12		
12m nach BoNT-A-Injektion		0,81 ±0,59 n= 7		

Tabelle 7A.: Auflistung aller mittleren apomorphininduzierten Rotationswerte und den mittleren Standardabweichungen hemiläsionierter bzw. scheinläsionierter Tiere vor und nach BoNT-A- bzw. schein-BoNT-A-Behandlung

Zeitpunkt	6-OHDA+ 100 pg BoNT	6-OHDA+ 1 ng BoNT	6-OHDA+ 2 ng BoNT	6-OHDA Schein-BoNT +	Schein-Schein
Vor ScheinLäsion					0,40 ±1,34 n= 8
4w nach Läsion	8,22 ±2,35 n= 8	9,75 ±3,16 n= 26	10,13 ±4,74 n= 16	9,91 ±3,16 n= 8	-0,42 ±0,47 n= 8
1m nach BoNT-A-Injektion	5,12 ±2,64 n= 8	-1,44 ±3,41 n= 25	-1,40 ±3,48 n= 15	6,32 ±3,01 n= 7	1,27 ±0,91 n= 8

Anhang

2m nach BoNT-A-Scheininjektion	7,70 ±4,85 n= 4				-0,35 ±0,78 n= 8
3m nach BoNT-A-Injektion		1,36 ±4,05 n= 25	-0,62 ±4,66 n= 15	7,53 ±3,76 n= 7	-0,24 ±0,98 n= 8
6m nach BoNT-A-Injektion		2,99 ±4,26 n= 17	3,46 ±6,16 n= 7	6,07 ±3,01 n= 7	-0,24 ±0,48 n= 8
9m nach BoNT-A-Injektion		4,42 ±3,14 n= 8		6,16 ±3,66 n= 7	-0,13 ±0,30 n= 7
12m nach BoNT-A-Injektion		5,73 ±3,72 n= 8		6,24 ±4,59 n= 7	0,78 ±0,10 n= 7

Tabelle 8A.: Auflistung aller mittleren amphetamininduzierten Rotationswerte von Wistar-Ratten denen nur BoNT-A bzw. dessen Vehikelsubstanz in das rechte CPU injiziert wurde

Zeitpunkt	100pg BoNT	2ng BoNT	Schein-BoNT
2w nach BoNT-A	0,96±1,07 n= 8	-0,04±1,98 n= 7	0,21±0,83 n= 6
2m nach BoNT-A-Injektion	0,56±0,83 n= 5	0,51±0,64 n= 5	0,26±0,36 n= 6
3m nach BoNT-A-Injektion	0,48±0,34 n= 5	0,25±1,07 n= 5	0,01±0,14 n= 6

Tabelle 9A.: Auflistung aller mittleren amphetamininduzierten Rotationswerte hemiläsionierter bzw. scheinläsionierter Tiere vor und nach BoNT-A- bzw. schein-BoNT-A-Behandlung

Zeitpunkt	6-OHDA+ 100 pg BoNT	6-OHDA+ 1ng BoNT	6-OHDA+ 2ng BoNT	6-OHDA Schein +	Schein-Schein
Vor ScheinLäsion					-0,73 ±3,61 n= 8
4w nach Läsion	-8,37 ±1,96 n= 8	-8,92±2,89 n= 26	-7,06±3,73 n= 16	-6,99±2,81 n= 8	-0,81 ±3,74 n= 8
1m nach BoNT-A-Injektion	-10,64 ±5,06 n= 8	-9,55±4,12 n= 25	-10,31±6,10 n= 15	-8,51±2,99 n= 7	-0,72 ±0,96 n= 8
2m nach BoNT-A-Injektion	-13,85 ±9,44 n= 4				-0,16 ±0,89 n= 8
3m nach BoNT-A-Injektion		-7,92±5,61 n= 25	-11,60±7,01 n= 15	-7,28±3,91 n= 7	-0,11 ±0,87 n= 8
6m nach BoNT-A-Injektion		-8,20±6,78 n= 17	-10,99±7,31 n= 7	-7,96±5,47 n= 7	-0,03 ±0,74 n= 8

Anhang

9m nach BoNT-A-Injektion		-8.92±6.30 n= 8		-7.52±5.13 n= 7	-0,33 ±0,81 n= 7
12m nach BoNT-A-Injektion		-8.20±5.82 n= 8		-7.00±5.85 n= 7	0,62 ±0,09 n= 7

Tabelle 10A.: Accelerod-Test: Zeit auf der Walze bis zum Sturz in s und Standardabweichung. Die Signifikanzwerte (p-Werte) beziehen sich für einen Wert immer auf den zeitgleich ermittelten Wert der läsierten und BoNT-A-behandelten Tiergruppe.

Zeitpunkt	6-OHDA+ 1ng BoNT	6-OHDA + Schein		Schein-Schein	
			p		p
2w nach Läsion	90,6 ±48,6	105,0 ±94,6	0,696	99,1 ±69,1	0,764
1m nach BoNT-A-Injektion	87,0 ±64,1	102,0 ±90,9	0,703	89,4 ±67,2	0,938
2m nach BoNT-A-Injektion				66,0 ±48,1	
3m nach BoNT-A-Injektion	59,7 ±35,2	65,3 ±55,1	0,809	49,8 ±48,1	0,638
6m nach BoNT-A-Injektion	36,0 ±19,9	62,0 ±32,8	0,100	64,4 ±49,2	0,193
9m nach BoNT-A-Injektion		52,9 ±23,1		48,3 ±48,4	
12m nach BoNT-A-Injektion		69,3 ±27,0		36,8 ±40,0	

Tabelle 11A.: Weg auf der Walze bis zum Sturz in m und Standardabweichung. Die Signifikanzwerte (p-Werte) beziehen sich für einen Wert immer auf den zeitgleich ermittelten Wert der läsierten und BoNT-A-behandelten Tiergruppe.

Zeitpunkt	6-OHDA+ 1ng BoNT-A	6-OHDA + Schein		Schein-Schein	
			p		p
2w nach Läsion	3,1 ±2,3	4,9 ±5,9	0,435	3,9 ±3,8	0,605
1m nach BoNT-A-Injektion	3,3 ±4,5	4,6 ±7,0	0,656	3,4 ±3,9	0,952
2m nach BoNT-A-Injektion				2,0 ±1,7	
3m nach BoNT-A-Injektion	1,7 ±1,5	2,1 ±2,5	0,655	1,5 ±1,9	0,846
6m nach BoNT-A-Injektion	0,8 ±0,5	1,7 ±1,5	0,162	2,0 ±1,8	0,131
9m nach BoNT-A-Injektion		1,3 ±0,8		1,4 ±1,7	
12m nach BoNT-A-Injektion		1,2 ±0,8		1,0 ±1,4	

Anhang

Tabelle 12A.: Endgeschwindigkeit beim Sturz in U/min und Standardabweichung. Die Signifikanzwerte (p-Werte) beziehen sich für einen Wert immer auf den zeitgleich ermittelten Wert der läsionierten und BoNT-A-behandelten Tiergruppe.

Zeitpunkt	6-OHDA+ BoNT-A	1ng	6-OHDA + Sham		Sham-Sham	
				p		p
2w nach Läsion	14,9 ±6,0		16,7 ±11,4	0,683	16,0 ±8,3	0,749
1m nach BoNT-A-Injektion	14,6 ±7,7		16,4 ±10,9	0,708	14,9 ±8,1	0,942
2m nach BoNT-A-Injektion					12,0 ±5,8	
3m nach BoNT-A-Injektion	11,3 ±4,2		12,0 ±6,6	0,819	10,2 ±5,8	0,663
6m nach BoNT-A-Injektion	8,4 ±2,4		11,5 ±3,9	0,102	11,9 ±5,9	0,190
9m nach BoNT-A-Injektion			10,5 ±2,8		10,0 ±5,8	
12m nach BoNT-A-Injektion			10,1 ±3,2		8,6 ±4,8	

Tabelle 13A: Schein-Läsion + Schein-BoNT-A Zeit in s auf Walze. Die p-Werte beziehen sich jeweils alle auf die vorhergehenden Ergebnisse der selben Tiergruppe.

	vor BoNT- A	4Wo	9Wo	13Wo	28Wo	40Wo	49Wo
Mittelwerte	99,1	89,4	66,0	49,8	64,4	48,3	36,8
Standardabweichung	69,1	67,2	48,1	48,1	49,2	48,4	40,0
p-Werte bezogen auf 2 Wo nach Läsion (vor BoNT-A)		0,122	0,047	0,018	0,085	0,024	0,015
p-Werte bezogen auf 4 Wo nach BoNT-A			0,105	0,018	0,298	0,030	0,023
p-Werte bezogen auf 9 Wo nach BoNT-A				0,517	0,485	0,264	0,258
p-Werte bezogen auf 13 Wo nach BoNT-A					0,379	0,505	0,172
p-Werte bezogen auf 28 Wo nach BoNT-A						0,587	0,099
p-Werte bezogen auf 40 Wo nach BoNT-A							0,333

Tabelle 14A.: Schein-Läsion + Schein-BoNT-A zurückgelegter Weg in m. Die p-Werte beziehen sich jeweils alle auf die vorhergehenden Ergebnisse der selben Tiergruppe.

	vor BoNT	4Wo	9Wo	13Wo	28Wo	40Wo	49Wo
Mittelwerte	3,921	3,394	2,038	1,501	2,019	1,443	0,990
Standardabweichung	3,826	3,937	1,735	1,879	1,849	1,695	1,388
p-Werte bezogen auf 2 W nach Läsion (vor BoNT-A)		0,174	0,057	0,029	0,112	0,054	0,037
p-Werte bezogen auf 4 Wo nach BoNT-A			0,161	0,065	0,333	0,096	0,073
p-Werte bezogen auf 9 Wo nach BoNT-A				0,502	0,573	0,117	0,172

Anhang

p-Werte bezogen auf 13 Wo nach BoNT-A					0,478	0,058	0,151
p-Werte bezogen auf 28 Wo nach BoNT-A						0,723	0,095
p-Werte bezogen auf 40 Wo nach BoNT-A							0,242

Tabelle 15A.: Schein-Läsion + Schein-BoNT Endgeschwindigkeit in U/min. Die p-Werte beziehen sich jeweils alle auf die vorhergehenden Ergebnisse der selben Tiergruppe.

	vor BoNT-A	4Wo	9Wo	13Wo	28Wo	40Wo	49Wo
Mittelwerte	15,988	14,857	12,033	10,214	11,886	9,983	8,583
Standardabweichung	8,293	8,064	5,793	5,776	5,935	5,777	4,815
p-Werte bezogen auf 2 Wo nach Läsion (vor BoNT-A)		0,126	0,048	0,019	0,088	0,026	0,016
p-Werte bezogen auf 4 Wo nach BoNT-A			0,105	0,020	0,304	0,033	0,024
p-Werte bezogen auf 9 Wo nach BoNT-A				0,562	0,469	0,320	0,268
p-Werte bezogen auf 13 Wo nach BoNT-A					0,400	0,454	0,151
p-Werte bezogen auf 28 Wo nach BoNT-A						0,608	0,097
p-Werte bezogen auf 40 Wo nach BoNT-A							0,322

Tabelle 16A.: Läsion + Schein-BoNT-A Zeit in s auf Walze. Die p-Werte beziehen sich jeweils alle auf die vorhergehenden Ergebnisse der selben Tiergruppe.

	vor BoNT-A	1Mo	3Mo	6Mo	9Mo	12Mo
Mittelwerte	105,000	102,000	65,343	61,971	52,914	69,312
Standardabweichung	94,620	90,894	55,089	32,848	23,127	26,985
p-Werte bezogen auf 2 W nach Läsion		0,448	0,486	0,467	0,339	0,387
p-Werte bezogen auf 4 W nach BoNT-A			0,206	0,271	0,183	0,249
p-Werte bezogen auf 3 Mo nach BoNT-A				0,810	0,424	0,527
p-Werte bezogen auf 6 Mo nach BoNT-A					0,297	0,388
p-Werte bezogen auf 9 Mo nach BoNT-A						0,781

Anhang

Tabelle 17A.: Läsion + Schein-BoNT-A zurückgelegter Weg in m. Die p-Werte beziehen sich jeweils alle auf die vorhergehenden Ergebnisse der selben Tiergruppe.

	vor BoNT-A	1Mo	3Mo	6Mo	9Mo	12Mo
Mittelwerte	4,911	4,619	2,144	1,700	1,303	1,233
Standardabweichung	5,901	7,032	2,548	1,490	0,810	0,809
p-Werte bezogen auf 2 W nach Läsion		0,513	0,416	0,358	0,268	0,296
p-Werte bezogen auf 4 W nach BoNT-A			0,324	0,314	0,250	0,276
p-Werte bezogen auf 3 Mo nach BoNT-A				0,450	0,286	0,374
p-Werte bezogen auf 6 Mo nach BoNT-A					0,298	0,382
p-Werte bezogen auf 9 Mo nach BoNT-A						0,826

Tabelle 18A.: Läsion + Schein-BoNT-A Endgeschwindigkeit (U/min). Die p-Werte beziehen sich jeweils alle auf die vorhergehenden Ergebnisse der selben Tiergruppe.

	vor BoNT-A	1Mo	3Mo	6Mo	9Mo	12Mo
Mittelwerte	16,713	16,357	11,957	11,543	10,529	10,114
Standardabweichung	11,365	10,903	6,624	3,948	2,777	3,243
p-Werte bezogen auf 2 W nach Läsion		0,449	0,487	0,468	0,343	0,388
p-Werte bezogen auf 4 W nach BoNT-A			0,205	0,270	0,184	0,249
p-Werte bezogen auf 3 Mo nach BoNT-A				0,806	0,441	0,529
p-Werte bezogen auf 6 Mo nach BoNT-A					0,333	0,393
p-Werte bezogen auf 9 Mo nach BoNT-A						0,751

Tabelle 19A.: Läsion + 1ng BoNT-A Zeit auf Walze in s. Die p-Werte beziehen sich jeweils alle auf die vorhergehenden Ergebnisse der selben Tiergruppe.

	vor BoNT-A	1Mo	3Mo	6Mo
Mittelwerte	14,906	14,587	11,313	8,438
Standardabweichung	5,961	7,671	4,230	2,398
p-Werte bezogen auf 2 W nach Läsion		0,564	0,003	0,001
p-Werte bezogen auf 4 W nach BoNT-A			0,074	0,100
p-Werte bezogen auf 3 Mo nach BoNT-A				0,165

Anhang

Tabelle 20A.: Läsion + 1 ng BoNT-A zurückgelegter Weg in m. Die p-Werte beziehen sich jeweils alle auf die vorhergehenden Ergebnisse der selben Tiergruppe.

	vor BoNT-A	1Mo	3Mo	6Mo
Mittelwerte	3,133	3,278	1,663	0,776
Standardabweichung	2,326	4,506	1,486	0,549
p-Werte bezogen auf 2 W nach Läsion		0,956	0,002	0,004
p-Werte bezogen auf 4 W nach BoNT-A			0,160	0,198
p-Werte bezogen auf 3 Mo nach BoNT-A				0,142

Tabelle 21A.: Läsion + 1 ng BoNT-A Endgeschwindigkeit in U/min. Die p-Werte beziehen sich jeweils alle auf die vorhergehenden Ergebnisse der selben Tiergruppe.

	vor BoNT-A	1Mo	3Mo	6Mo
Mittelwerte	14,906	14,587	11,313	8,438
Standardabweichung	5,961	7,671	4,230	2,398
p-Werte bezogen auf 2 W nach Läsion		0,564	0,003	0,001
p-Werte bezogen auf 4 W nach BoNT-A			0,074	0,100
p-Werte bezogen auf 3 Mo nach BoNT-A				0,165

Tabelle 22A.: In dieser Tabelle sind die durchschnittlichen Endgeschwindigkeiten der Walzen der Accelerod-Apparatur beim Sturz der Tiere für die bilateral BoNT-A-behandelte, bilateral scheinbehandelte und gänzlich unbehandelte Ratten dargestellt.

Gruppen	N	v der Walze in U/min	Standardabweichung	Mittlerer Standardfehler	p versus BoNT-A
BoNT-A	16	16,016	6,155	1,539	
Schein-BoNT-A	20	21,299	6,923	1,548	0,018
Kontrolle	18	22,415	6,092	1,436	0,006

Tabelle 23A.: Mittlere zurückgelegte Strecken der 6-OHDA-läsionierten und mit 1 ng BoNT-A-behandelten Tiere im Open Field sowie Signifikanzprüfung.

	vor BoNT-A	1Mo	3Mo	6Mo	9Mo	12Mo
Strecke in cm	2770	2398	1854	1792	2024	1830
Standardabweichung	524	614	546	618	426	419
p(prä-BoNT-A)		0,000002	0,000000002	0,00002	0,306	0,297
p(1mo)			0,00000004	0,001	0,443	0,393
p(3mo)				0,937	0,903	0,633
p(6mo)					0,434	0,807
p(9mo)						0,290

Anhang

Tabelle 24A.: Mittlere zurückgelegte Strecken der 6-OHDA-läsionierten und mit 2 ng BoNT-A-behandelten Tiere im Open Field sowie Signifikanzprüfung.

	vor BoNT-A	1Mo	3Mo	6Mo
Strecke in cm	2740	2148	1874	1974
Standardabweichung	298	506	483	499
p(prä-BoNT-A)		0,004	0,0007	0,009
p(1mo)			0,056	0,259
p(3mo)				0,871

Tabelle 25A.: Mittlere zurückgelegte Strecken der 6-OHDA-läsionierten und schein-BoNT-A-behandelten Tiere im Open Field sowie Signifikanzprüfung.

	vor BoNT-A	1Mo	3Mo	6Mo	9Mo	12Mo
Strecke in cm	3215	2772	2141	2380	2668	2748
Stabw	490	788	730	794	762	1243
p(prä-BoNT-A)		0,027	0,0003	0,001	0,033	0,164
p(1mo)			0,001	0,008	0,603	0,921
p(3mo)				0,002	0,045	0,061
p(6mo)					0,237	0,207
p(9mo)						0,761

Tabelle 26A.: Mittlere zurückgelegte Strecken der schein-läsionierten und schein-BoNT-A-behandelten Tiere im Open Field sowie Signifikanzprüfung.

	vor BoNT-A	1Mo	3Mo	6Mo	9Mo	12Mo
Strecke in cm	2469	2032	2266	2089	1935	2676
Stabw	652	437	537	379	463	514
p(prä-BoNT-A)		0,014	0,138	0,017	0,012	0,361
p(1mo)			0,024	0,293	0,548	0,009
p(3mo)				0,137	0,109	0,070
p(6mo)					0,242	0,009
p(9mo)						0,001

Tabelle 27A.: Vergleich der spontanen motorischen Aktivität der verschiedenen Versuchstiergruppen im Open Field. Die p(1)-Werte beziehen sich jeweils auf den Unterschied zu den Resultaten der läsionierten und schein-BoNT-A-behandelten Kontrolltiere, die p(2)-Werte nehmen Bezug zu den Laufstrecken der scheinläsionierten und schein-BoNT-A-behandelten Ratten und wurden mittels eines ungepaarten T-Testes ermittelt.

Zeitpunkt	6-OHDA+ 1ng BoNT-A	6-OHDA+ 2ng BoNT-A	6-OHDA + Sham	Sham-Sham
2w nach Läsion	2770 ±524 p(1): 0,047 p(2): 0,262		2740 ±298 p(1): 0,045 p(2): 0,323	3215 ±490
1m nach BoNT-A-Injektion	2398 ±614 p(1): 0,280 p(2): 0,084	2148 ±506 p(1): 0,115 p(2): 0,664	2772 ±788	2469 ±652
2m nach BoNT-A-				2032 ±437

Anhang

Injektion				
3m nach BoNT-A-Injektion	1854 ±546 p(1): 0,363 p(2): 0,195	1874 ±483 p(1): 0,447 p(2): 0,389	2141 ±730	2266 ±537
6m nach BoNT-A-Injektion	1792 ±618 p(1): 0,126 p(2): 0,572	1974 ±499 p(1): 0,366 p(2): 0,913	2380 ±794	2089 ±379
9m nach BoNT-A-Injektion	2024 ±426 p(1): 0,134 p(2): 0,096		2668 ±762	1935 ±463
12m nach BoNT-A-Injektion	1830 ±419 p(1): 0,121 p(2): 0,682		2748 ±1243	2676 ±514

Tabelle 28A.: Kreuzungen der Plattformposition während des Water-Mazes-Testes

Gruppe	N	Durchschnittliche Kreuzungen	Mittlerer Standardfehler
BoNT-A	17	5,75	0,461
Schein-BoNT-A	20	5,60	0,351
Unbehandelte Kontrolle	18	6,00	0,507

Tabelle 29A.: Zeit zum Erreichen der Plattformposition im Water-Maze-Test

Gruppe	N	Latenzzeit in ms	Mittlerer Standardfehler
BoNT-A	17	5566,4	1255,4
Schein-BoNT-A	20	4413,3	1154,8
Unbehandelte Kontrolle	18	3670,1	515,3

Tabelle 30A.: Durchschnittliche Schwimgeschwindigkeiten der Versuchstiergruppen im Water Maze in cm/s

Gruppe	N	Durchschnittliche v	Standardabweichung	Mittlerer Standardfehler
BoNT-A	17	24,869	3,618	0,878
Schein-BoNT-A	20	22,235	4,051	0,906
Unbehandelte Kontrolle	18	22,414	3,725	0,878

7.4. Publikationen

7.4.1. Veröffentlichungen

Hawlichschka A, Haas SJ, Schmitt O, Weiss DG, Wree A (2007) Effects of systemic PSI administration on catecholaminergic cells in the brain, adrenal medulla and carotid body in Wistar rats. *Brain Res*, 1173: 137-144.

Hawlichschka A, Antipova V, Schmitt O, Witt M, Benecke R, Mix E, Wree A Intracerebrally Applied Botulinum Neurotoxin in Experimental Neuroscience. *Curr Pharm Biotechnol*. accepted

Wree A, Mix E, Hawlichschka A, Antipova V, Witt M, Schmitt O, Benecke R (2011) Intrastratial botulinum toxin abolishes pathologic rotational behaviour and induces axonal varicosities in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 41: 291-298.

7.4.2. Posterbeiträge und Fachvorträge

1. Hawlichschka A., Haas S., Schmitt O., Wree A.
Proteasome inhibition failed to act as a new animal model of Parkinson's disease in Wistar rats, but led to changes in tyrosine hydroxylase contents of olfactory bulb and adrenal medulla
(7. Treffen der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, 29.03.2007 - 01.04.2007 in Göttingen)
2. Hawlichschka A., Haas S., Schmitt O., Wree A.
Proteasome inhibition as a model for Parkinson's Disease?
(Adult Neurogenesis Symposium, Oktober 2007 in Dresden)
3. Antipova V., Hawlichschka A., Wree A., Schmitt O., Benecke R., Mix E.
Verhaltensänderungen von Ratte nach intrazerebraler Injektion von Botulinumtoxin
(2. Deutscher Botulinumtoxin-Kongress, 01. - 02.05.2009 in Rostock)
4. Hawlichschka A., Wree A., Antipova V., Witt M., Schmitt O., Benecke R., Mix E.
Intrastriatiale Injektion von Botulinumtoxin führt zu charakteristischen morphologischen Veränderungen im Gehirn von Ratten
(2. Deutscher Botulinumtoxin-Kongress, 01. - 02.05.2009 in Rostock)
5. Mix E., Antipova V., Hawlichschka A., Schmitt O., Benecke R., Wree A.
Wirkungen von Botulinumtoxin bei intrazerebraler Injektion im Parkinson-Tiermodell
(2. Deutscher Botulinumtoxin-Kongress, 01. - 02.05.2009 in Rostock)
6. Wree A., Hawlichschka A., Antipova V., Schmitt O., Benecke R., Mix E.
Intrazerebrale Applikation von Botulinumtoxin A im Tierexperiment – neuroanatomische Aspekte
(2. Deutscher Botulinumtoxin-Kongress, 01. - 02.05.2009 in Rostock)
7. Antipova V., Draeger D., Hawlichschka A., Benecke R., Mix E.

Anhang

- Behavioural improvements of hemiparkinsonian rats after intrastriatal injection of botulinum toxin A
(26. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 23. - 25.09.2009)
8. Hawlitschka A., Schmitt O., Antipova V., Benecke R., Wree A.
Intrastriatal application of botulinum toxin into Wistar rats leads to morphologic changes
(26. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 23. - 25.09.2009)
 9. Hawlitschka A., Schmitt O., Wree A., Antipova V., Mix E., Benecke R.
Intracerebral application of botulinum toxin A in Wistar rats – neuroanatomic aspects
(XVIII WFN World Congress of Parkinson's Disease and Related Disorders, Miami Beach, Fl, USA, December 13. - 16.12.2009)
 10. Wree A., Antipova V., Hawlitschka A., Benecke R., Mix E.
Behavioral improvements of Hemiparkinsonian rats after injektion of botulinum toxin A
(XVIII WFN World Congress of Parkinson's Disease and Related Disorders, Miami Beach, Fl, USA, 13. - 16.12.2009)
 11. Antipova V., Hawlitschka A., Dräger D., Benecke R., Mix E., Wree A.
Changes in behaviour of hemiparkinsonian rats after intrastriatal injection of botulinum neurotoxin A
(105. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft in Hamburg, 29.03.2010)
 12. Hawlitschka A., Schmitt O., Antipova V., Benecke R., Wree A.
Longterm investigation of mophological changes in the rat brain after botulinum toxin A application
(105. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft in Hamburg, 29.03.2010)
 13. Hawlitschka A., Wree A., Antipova V., Witt M., Schmitt O., Benecke R., Mix E.
Morphologic changes after intrastriatal botulinum toxin a injection for the purpose of Parkinsons's disease sympoms
(6th International Symposium on NEUROPRTOCTION AND NEUROREPAIR 01. - 04.10.2010)
 14. Mix E., Hawlitschka A., Holzmann C., Dräger D., Antipova V., Schmitt O., Benecke R., Wree A.
Wirkung von Botulnumtoxin im ZNS - Möglichkeiten zukünftiger Therapien
(3. Deutscher Botulinumtoxin-Kongress, 06. - 07.05.2011 in Wiesbaden)
 15. Wree A., Holzmann C., Hawlitschka A., Mix E., Benecke R., Dräger D.
Effects of intrastriatal botulinum neurotoxin a in rats
(28. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 28.09.2011 bis 30.09.2011)
 16. Hawlitschka A., Wree A., Antipova V., Witt M., Schmitt O., Benecke R., Mix E.
Intrastriatal Botulinum toxin A injection ameliorates some motor abilities of hemiparkinson rats and leads to morphological changes in the brain
(9. Treffen der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, 23.03.2011 - 27.03.2011 in Göttingen)

17. Wree A., Mix E., Benecke R., Hawlitshka A.
The beneficial effect of intrastriatal botulinum neurotoxin in rats with hemiparkinsonism depends on the depletion of acetylcholine
(XIX WFN World Congress of Parkinson's Disease and Related Disorders, Shanghai, China, 11. - 14.12.2011)

18. Dräger D., Holzmann C., Hawlitshka A., Mix E., Benecke R., Wree A.
Functional and morphological modifications of bilateral intrastriatal botulinum neurotoxin A application in Wistar rats
(XIX WFN World Congress of Parkinson's Disease and Related Disorders, Shanghai, China, 11. - 14.12.2011)