

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. A. Wree

„Quantifizierung und motorisch-funktionelle Analyse von
postlesional beobachtbaren Tyrosinhydroxylase-
immunreaktiven Neuronen im 6-OHDA-Parkinson-Modell
der Maus.“

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Martin Duckert

Rostock, 2012

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Schmitt

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Johannes Thome

3. Gutachter: Prof. Dr. Claudia Grothe

Einreichung: 24.09.2012

Verteidigung: 10.12.2013

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Morbus Parkinson.....	1
1.2 Symptome.....	1
1.3 Ätiologie.....	2
1.4 Therapiemöglichkeiten.....	3
1.4.1 Pharmakotherapeutische Optionen.....	3
1.4.2 Operative Optionen.....	5
1.4.3 Zellersatztherapie.....	6
1.5 Tiermodelle.....	7
1.5.1 6-Hydroxydopamin-(6-OHDA)-Modell.....	7
1.5.2 N-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-(MPTP)-Modell.....	9
1.5.3 Transgene Tiermodelle.....	10
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Tiere und Tierhaltung.....	14
2.2 Bromdesoxyuridin-(BrdU)-Gabe.....	14
2.3 Unilaterale 6-Hydroxydopamin-(6-OHDA)-Läsion.....	14
2.4 Tierverhaltensexperimente.....	15
2.4.1 Zylindertest.....	15
2.4.2 Apomorphinrotationstest.....	16
2.5 Perfusion und Gehirnentnahme, Aufarbeitung der Gehirne.....	17
2.6 Immunhistochemie.....	18
2.6.1 Verwendete Antikörper.....	18
2.6.2 Primärantikörper.....	18
2.6.2.1 Bromdesoxyuridinmarkierung (BrdU).....	18

2.6.2.2	Tyrosinhydroxylasemarkierung (TH).....	19
2.6.3	Sekundärantikörper	19
2.6.4	Protokoll BrdU-TH-Doppelmarkierung	20
2.7	Auswertung und Dokumentation der immunhistochemischen Präparate	22
3	Ergebnisse.....	24
3.1	Zylindertest	24
3.2	Apomorphin-Rotationstest	25
3.3	Immunhistochemie – BrdU/TH-Doppelmarkierung	26
4	Diskussion	35
4.1	Auswertung der motorischen Tests	35
4.2	Auswertung der immunhistochemischen Färbung.....	39
4.2.1	Beurteilung der Primärantikörper.....	39
4.2.2	BrdU/TH-Doppelmarkierung	39
4.3	Beantwortung der Fragestellung.....	42
5	Literaturverzeichnis.....	46
6	Anhang	62
7	Thesen.....	71
8	Erklärung	72
9	Lebenslauf	73
10	Publikationen	74

11 Danksagung..... 75

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Lösung	Avidin-Biotin-Komplex-Lösung
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	Bromdesoxyuridin
COMT	Katechol-O-Methyl-Transferase
DAB	Diaminobenzidin
(mt)DNS	(mitochondriale) Desoxyribonukleinsäure
EW	Einwohner
GP(m)	Globus pallidus (pars medialis)
GSH	Gluthation
HCl	Salzsäure
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
kDa	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MAO	Monoaminoxidase
(r)MFB	(rechtes) mediales Vorderhirnbündel
MPTP	N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NaCl	Kochsalz
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRS	Normales Hasenserum
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Parkinson-Erkrankung
(m)RNA	(Messenger) Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SN(c)	Substantia nigra (pars compacta)
SOD	Superoxiddismutase
SSC-Puffer	Kochsalz-Natriumcitrat-Puffer
SVZ	Subventrikuläre Zone
TH	Tyrosinhydroxylase
6-OHDA	6-Hydroxydopamin

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

Erstmals wurde die Parkinsonsche Krankheit (PD) 1817 von James Parkinson beschrieben („An Essay on the Shaking Palsy“). Es handelt sich um die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung, deren mittlere Prävalenz in Europa bei 0,1 bis 0,3% liegt, jedoch altersabhängig auf 1,3 bis 1,5% bei den über 60-Jährigen ansteigt (von Campenhausen et al., 2005), sodass je nach Altersgruppe 100/10⁵ EW bis 1800/10⁵ EW betroffen sind. Allein in Deutschland geht man von 250.000 bis 400.000 Erkrankten aus (Oertel et al., 2003; Gerlach et al., 2007).

1.2 Symptome

Als Kardinalsymptome gelten Bradykinese, Rigor, Tremor und die posturale Instabilität, welche aber erst nach Verlust von 80% der nigrostriatalen Neurone und mehr als 85% des Dopamins im Striatum eintreten (Marsden, 1982; Jellinger et al., 1991). Doch auch Riechstörungen sind bei nahezu allen Parkinsonpatienten manifest (Sommer et al., 2004). Im Verlauf der Erkrankung entwickeln viele Patienten neuropsychiatrische Defizite, wie Demenz und Depression, und vegetative Symptome, unter anderem Hypersalivation, Seborrhö und Sialorrhö (Poewe, 1993; Aarsland et al., 2003).

Die Symptomatik gründet sich auf einen stetig fortschreitenden Verlust und eine Degenerationen von nigrostriatalen und mesolimbischen dopaminergen Neuronen (Hassler, 1938; Dehay et al., 2011), serotonergen Neuronen in den Nuclei raphe obscurus und raphe medialis (Halliday et al., 1990) und den noradrenergen Neuronen im Locus coeruleus (Jellinger, 1991) sowie Ablagerungen von Lewy-Körperchen in der Substantia nigra. Die Verschaltung der Basalganglien beim Gesunden und IPS-Erkrankten ist in Abb. 1 dargestellt. Der zentrale Unterschied besteht im erwähnten Untergang dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta, was zum Wegfall modulierender Funktionen auf den Nucleus subthalamicus und das Striatum führt. In Folge dessen kommt es über direkte und indirekte Verschaltungen zu einer so genannten Hyperexzitation des Globus pallidus internus und der Substantia nigra pars reticularis, welche in einer übersteigerten Hemmung des ventrolateralen Thalamus und damit in einer geminderten Erregung des motorischen Cortex resultiert.

Einleitung

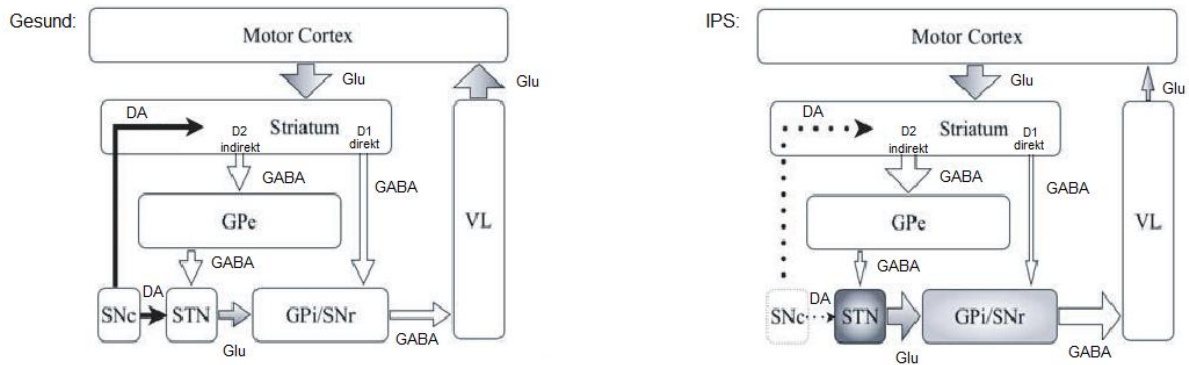


Abb. 1) Vereinfachte schematische Darstellung der Basalganglienschleife beim gesunden Individuum und einem IPS-Erkrankten:

Beim Gesunden wird das Striatum durch Afferenzen aus dem motorischen Cortex über den Neurotransmitter Glutamat erregt und bewirkt durch Ausschüttung von GABA über den direkten und indirekten Weg eine Hemmung im GPI, der SNr und via GPe auch im STN. Sowohl Striatum, als auch STN werden dopaminerg aus der SNc moduliert. Letztlich resultiert eine Hemmung des VL und somit eine Minderung der Exzitation des motorischen Cortex.

Beim IPS-Erkrankten entsteht durch den Neuronenuntergang in der SNc nahezu ein Wegfall der Modulation von STN und Striatum. Über den direkten Weg werden GPI und SNr weniger inhibiert, über den indirekten jedoch erfolgt eine verstärkte Hemmung des GPe und damit der Kontrollverlust über den STN. Die Hyperexzitation von GPI und SNr führt zu einer starken Hemmung des VL, was die Erregung des motorischen Cortex stark minimiert.

Abkürzungen: DA=Dopamin, Glu=Glutamat, GABA=gamma-Aminobuttersäure, GPe=Globus pallidus externus, GPI=Globus pallidus internus, SNc=Substantia nigra pars compacta, SNr=Substantia nigra pars reticularis, STN=Nucleus subthalamicus, VL=ventrolateraler Thalamus

(modifiziert nach Pan et al., 2010)

1.3 Ätiologie

Aufgrund der bis heute meist ungeklärten Ätiologie dieser Erkrankung spricht man vom idiopathischen Parkinson-Syndrom (IPS). Es existieren verschiedene Hypothesen zur Genese des IPS: Proteinaggregation (u.a. Bennett et al., 1999), Exzitotoxizität (u.a. Gerlach et al., 1996); Störungen der Ca^{2+} -Homöostase (Sheehan et al., 1997), der mitochondrialen Funktion oder des Eisenstoffwechsels sowie entzündliche Prozesse (McGeer et al., 1988). Modellhaft geht man davon aus, dass polygenetische Ursachen, ein Zusammenwirken exogener (Toxinbelastung) und endogener (Neuronenvulnerabilität) Faktoren das IPS hervorrufen (Riess et al., 2006; Chade et al., 2006; Mellick, 2006). Im Folgenden wird auf die momentan favorisierte, Hypothese des oxydativen Stresses (u.a. Jenner, 2003; Halliwell, 2006) eingegangen.

Trotz der, im Verhältnis zum Körper, geringen Masse verbraucht das Gehirn etwa 20% des basalen Sauerstoffes zur eigenen ATP-Produktion. Durch die Reaktionen der Atmungskette und der Synthese von Dopamin in den dopaminhaltigen Zellen entstehen diverse Sauerstoffradikale (ROS), unter anderem Superoxid-Radikal-

Einleitung

Anionen, Hydroxyl-Radikale und Stickstoffmonoxid (NO), welche zu Membranschäden durch Lipidperoxidation, DNS-Schäden und Proteinveränderungen führen (Halliwell, 2006). Aufgrund der hohen Reaktivität ist der direkte Nachweis von Radikalen zur Untermauerung dieser Hypothese kaum möglich, sodass geschädigte Biomoleküle und post-mortale Konzentrationsmessungen von antioxidativ wirkenden Enzymen zumindest eine Beteiligung von ROS am IPS nahelegen. Dexter et al. (1994) zeigten, dass eine deutliche Erniedrigung der Gluthation-(GSH)-Konzentration sowie eine Erhöhung der Superoxiddismutase-(SOD)-Aktivität in der Substantia nigra (SN) bei PD-Erkrankten zu verzeichnen ist, was auf eine erhöhte Radikalbildung hindeutet, da auch das Eisen(II)/Eisen(III)-Verhältnis in den betroffenen Zellen umgekehrt wurde (Sofic et al., 1988). Untermauert werden diese Befunde durch eine geminderte Menge an freien Fettsäuren und eine erhöhte Konzentration von 8-Hydroxy-deoxyguanosin in den betroffenen Zellen (Ross et al., 2001) als Resultat der Lipidperoxidation und DNS-Veränderung. Letztere zeigen sich auch an mtDNS-Deletionen dopaminergener Zellen der SNc (Manfredi, 2006). Nicht nur das vermehrte Anfallen von Radikalen, auch die geminderte Detoxifikation mittels Komplex-I-Reaktionen in der SN spielt bei der Schädigung der Neurone eine Rolle zur Genese des IPS (Reichmann und Riederer, 1989; Schapira et al., 1990).

1.4 Therapiemöglichkeiten

Zurzeit ist das IPS nicht kausal therapierbar, sodass in der Regel auf symptomatisch-funktionellen Ersatz der zugrundegegangenen dopaminergen Neurone zurückgegriffen werden muss. Wenn nach Diagnosestellung umgehend effektiv therapiert wird, ergibt sich, nach Studien von Cummings (1997), für den Patienten eine durchschnittliche Lebenserwartung. Des Weiteren kann durch den aufschiebenden und kompensatorischen Effekt der Medikation in den ersten Jahren ohne motorische Einschränkungen möglich sein (Rascol et al., 2002).

1.4.1 Pharmakotherapeutische Optionen

Als „Goldstandard“ in der pharmakologischen Therapie des IPS wird häufig L-DOPA in der Kombination mit einem DOPA-Decarboxylasehemmer (Carbidopa, Benserazid) angesehen. L-DOPA ist die Vorstufe des Neurotransmitters Dopamin, weist aber im Gegensatz zu diesem die Transportfähigkeit durch die Blut-Hirnschranke auf. Der so ermöglichte Übertritt vom Blut ins Hirngewebe führt zur Aufnahme des Pharmakons

Einleitung

in dopaminerge Neurone, welche über die zelleigene DOPA-Decarboxylase den mangelnden Neurotransmitter Dopamin synthetisieren können (Melamed et al., 2000). Die fixe Kombination mit einem nicht Blut-Hirnschranken-gängigen DOPA-Decarboxylasehemmer hat sich sowohl zur Minderung von unerwünschten vegetativen Wirkungen, als auch zur Konzentrationserhöhung des L-DOPA im Blut bei gleicher Dosis, bewährt. Dies führte zur Dosisreduktion (Tintner und Jankovic, 2002), was letztlich auch zum Hinauszögern eines L-DOPA-Spät syndroms (Langzeittherapiekomplicationen wie Psychosen, Dyskinesien, Freezing und Wearing-Off-Phänomene) beiträgt. Schon Cedarbaum et al. (1991) zeigten, dass bei L-DOPA-Monotherapien nach zehn Jahren zwei Drittel aller Patienten Dyskinesien aufwiesen, was vor allem im Hinblick auf ein Erkranken im jungen Alter vermehrt Probleme aufwirft (Herzog et al., 2003; Follett, 2004).

Dopaminagonisten (Bromocriptin, Cabergolin, Pergolid, Pramipexol, u.a.) stimulieren mit präparatabhängiger Selektivität die verschiedenen D₁-D₅ Subtypen des Dopaminrezeptors was durch eine transmittersmangelbedingte Hochregulation der Dopaminrezeptoren verstärkt die Wirkung (Chaturvedi et al., 2003). Pharmaka dieser Gruppe können augmentativ oder in Kombination genutzt werden, um beispielsweise das Auftreten von Dyskinesien unter L-DOPA zu mindern (Montastruc et al., 1994), was die Dopaminagonisten besonders für den Einsatz bei jungen Patienten geeignet macht (Reichmann et al., 2003).

Einer der stärksten Dopaminagonisten ist Apomorphin. Es handelt sich hierbei ursprünglich um einen Morphinabkömmling, der sowohl prä- als auch postsynaptisch D₁-, D₂- und D₃-Rezeptoren besonders im Globus pallidus und Nucleus subthalamicus stimuliert (LeWitt, 2004; Kolls und Stacy, 2005). Aufgrund seiner sehr kurzen Plasmahalbwertszeit von 20 bis 30 Minuten, seiner hohen Lipophilie und der damit verbundenen geringen Anschlagzeit (t_{max}) wird es für subkutane Infusionssysteme und „Rescue-Pen's“ bei Off-Phasen eingesetzt. Wegen seines hohen emetogenen Potentials wird in der Regel ein Einschleichen zusammen mit Domperidon durchgeführt (Gerlach et al., 2007).

Monoaminoxidase (MAO)-B-Hemmer (Selegilin, Rasagilin) sind irreversible Enzyminhibitoren, welche die Wirkung des Dopamin abbauende Enzyms MAO-B im

Einleitung

synaptischen Spalt negieren, was die Dopaminkonzentration im synaptischen Spalt erhöht (Gerlach und Riederer, 1999). Dies führt zur Verzögerung im Einsatz von L-DOPA sowie einer geringeren L-DOPA-Dosis im Verlauf der Therapie (The Parkinson Study Group, 1993 und 2002; Myllylä et al., 1997). Eine weitere günstige Eigenschaft ist das neuroprotektive Potential beider Wirkstoffe bei weitestgehend geringen Nebenwirkungen (The Parkinson Study Group, 1993 und 2002).

Ein weiteres, besonders peripher vorkommendes Enzym zum Dopaminabbau ist die Katechol-O-Methyl-Transferase (COMT). Sie kann mittels reversibler Inhibitoren (Entacapon, Tolcapon) peripher oder zentral gehemmt werden (Gerlach et al., 2007). Dies führt zu einer signifikanten Steigerung der L-DOPA-Bioverfügbarkeit (ca. 20-40%) und einer Verlängerung der Eliminationshalbwertszeit (ca. 37%). Auch hier kann es wieder zur L-DOPA-Dosisreduktion mit Komplikationsminimierung genutzt werden (McNeely und Davis, 1997; Gerlach et al., 2004). Die Nebenwirkungen sind bei Entacapon meist gering (Schwindel, Übelkeit) bei Tolcapon jedoch gravierender (Leberschädigung) (Gerlach et al., 2007).

Da es beim IPS nicht nur zu einem Mangel an Dopamin kommt, sondern auch Dysbalancen bei Neurotransmittern, wie Glutamat, Acetylcholin, Serotonin und Noradrenalin bestehen, werden auch Pharmaka eingesetzt, welche in diesen Transmittersystemen wirken. NMDA-Antagonisten (zum Beispiel Amantadin) sollen überaktive Neurone im Nucleus subthalamicus hemmen, akinetischen Krisen entgegenwirken und zusätzlich eine neuroprotektive Funktion besitzen (Chase et al., 2000). Die Anticholinergika (Biperiden, Bornaprin, u.a.) sind reversible Antagonisten und können je nach Wirkstoff gegen unterschiedliche Symptome der PD wirken.

1.4.2 Operative Optionen

Durch die hohe Nebenwirkungsrate und die Komplikationen einer L-DOPA-Langzeittherapie (vgl. 1.4.1) wurden seit der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts stereotaktische, chirurgische Verfahren durchgeführt. Destruierende Eingriffe, wie die Pallidotomie und die Thalamotomie mittels Thermokoagulation, werden aufgrund des Risikos verschiedener neurologischer Defizite (kognitive Defizite, Dysarthrie, Dysphagie) nur unilateral und im Allgemeinen heute eher selten verwandt (Gerlach et al., 2007).

Einleitung

Aufgrund eines besseren Verständnisses der Pathophysiologie des IPS, wurde erwogen durch Elektrostimulation hyperaktive Neurone des Globus pallidus pars medialis (GPM) und Nucleus subthalamicus reversibel zu hemmen (Benabid et al., 1991). Diese hochfrequente Stimulation führt vermutlich zur Depolarisation der Nervenzellen eines Gebietes und so letztlich zur retrograden Inhibierung (McIntyre et al., 2004). Hierbei werden je nach dominierender Symptomatik uni- oder bilateral Elektroden in GPM (bei Dyskinesien) oder Nucleus subthalamicus (bei Tremor) eingebracht und mit einem subkutanen Steuergerät verbunden (Follett, 2004). Mit Hilfe dieses Verfahrens besteht die Möglichkeit der Reduktion der L-DOPA-Dosis um bis zu 60 % (Toda et al., 2004) bei guter Symptomkontrolle über einen mittelfristigen Zeitraum von mindestens zwei Jahren (Kleiner-Fisman et al., 2010). Grundlegend sind auch hier die Auswahl der richtigen Patienten, unter anderem mit dem L-DOPA-Test (Besserung der Symptome nach L-DOPA-Gabe um mindestens 30 %), und die Vermittlung, dass auch dieses Verfahren keine Heilung darstellt. Des Weiteren sind die Risiken des Eingriffs, die damit verbundenen Kosten und die stetige Verfügbarkeit einer geeigneten Nachsorge zu bedenken.

1.4.3 Zellersatztherapie

Die Erkenntnis, dass das Krankheitsbild des IPS maßgeblich durch den Verlust dopaminerger Neurone bestimmt wird, war die Grundlage der therapeutischen Idee der Zellersatzverfahren. Über den funktionell-pharmakologischen Ersatz geht diese experimentelle Therapieoption jedoch hinaus. So sollen modifizierte dopaminerge Neurone in das Striatum eingebracht werden (Björklund und Lindvall, 2000; Lindvall und Hagell, 2002), welche nach Möglichkeit nicht nur lokal die Funktion erhalten (quasi als „kontinuierlicher Dopamingenerator“), sondern bestenfalls auch vom Hirn des Patienten in die verschiedenen neurophysiologischen Verschaltungen integriert werden und so eine vollständige Heilung bewirken. Bei erfolgreicher Umsetzung könnte so die mit Langzeitnebenwirkungen behaftete L-DOPA-Therapie bei einigen Patienten abgesetzt werden und bei anderen zumindest in den Hintergrund treten (Brundin et al., 2010). Die Auswahl des geeigneten Patienten gestaltet sich gerade bei dieser Therapieoption als sehr schwierig, so zeigte sich, dass wider Erwarten das Alter des Empfängers lediglich die Erholungsgeschwindigkeit des Transplantates beeinflusst, nicht aber den eigentlichen Therapieerfolg beeinflusst (Ma et al., 2010). Seit dem Beginn der Zellersatzexperimente konnten einige Studien durchaus positive

Einleitung

Effekte belegen (Lindvall et al., 1990, 1994; Freed et al., 1992; Hauser et al., 1999; Hagell und Brundin, 2001). Letzte doppelblinde, placebokontrollierte Studien zeigten jedoch, dass es nach einem Jahr keinen signifikanten Unterschied zwischen Transplantat- und Placebogruppe gab (Freed et al., 2001; Olanov et al., 2003). Als Probleme, in welcher die Erklärung für die Diskrepanz zwischen den verschiedenen Studien zu sehen ist, werden unter anderem die Verfügbarkeit und Menge des einzubringenden Transplantatmaterials, der neurochirurgische Zugangsweg (Ma et al., 2002) und die, nach momentaner Studienlage, voraussichtliche Notwendigkeit einer stetigen Immunsuppression (Brundin et al., 2010) angeführt.

1.5 Tiermodelle

Grundlage jeglicher therapeutischer Bestrebungen ist das Verständnis der Erkrankung. Aus einfach nachvollziehbaren ethischen Gründen beschränken sich Forschungen zu eben diesen Grundlagen in der Regel auf nicht- bzw. minimal-invasive oder postmortale Patientenuntersuchungen. Es liegt also auf der Hand, dass ein möglichst detailgetreues und der Forschung zugängliches Modell der Erkrankung geschaffen werden muss. So können Krankheiten erforscht, Therapien erprobt und letztlich auch Reaktionen und Wechselwirkungen mit und durch spätere Patienten untersucht werden.

1.5.1 6-Hydroxydopamin-(6-OHDA)-Modell

Das 6-OHDA-Modell der Ratte wurde schon am Ende der 60er Jahre entwickelt (Ungerstedt, 1968). 6-OHDA ist ein Neurotoxin, welches lokal injiziert werden muss, da es nicht in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Es wird nach der stereotaktischen Applikation in einen Ventrikel, die SN, das Striatum oder das mediale Vorderhirnbündel (MFB) von katecholaminergen Neuronen über den Monoamintransporter aufgenommen (Ungerstedt, 1968; Zigmond und Stricker, 1989). Zur selektiven Schädigung dopaminergener Neurone kann zusätzlich vorab die Gabe eines Noradrenalin-Transporter-Hemmstoffes (zum Beispiel Desipramin) erfolgen (Breese und Traylor, 1970). Das aufgenommene Neurotoxin führt in den Mitochondrien der dopaminergenen Neurone zu einer Hemmung des I. und IV. Komplexes der Atmungskette und somit zur Entstehung von freien Radikalen (Glinka und Youdim, 1995; Glinka et al., 1997), welche letale Zellschäden hervorrufen. Der beschriebene Effekt ist ein, im Vergleich zum IPS, zügiger Prozess (Betarbet et al.,

Einleitung

2000), welcher bei unilateraler Injektion auch nur ipsilateral die genannten Auswirkungen zeigt (Beal, 2001). Die Entstehung von Lewy-Körperchen konnte hier nicht beobachtet werden (Dawson et al., 2002). Die Degeneration der dopaminergen Neurone setzt bei Applikation von 6-OHDA in die SN oder das MFB nach etwa ein bis zwei Tagen ein und bewirkt bei Ratten so eine Schädigung von mehr als 95% fünf Tage „post injectionem“ (Schmidt et al., 1983; Zuch et al., 2000). Sauer und Oertel (1994) zeigten dazu im Gegensatz, dass eine 6-OHDA-Injektion in das Striatum eine eher langsame, über Wochen (Beal, 2001) progressiv-retrograde Degeneration der nigrostriatalen Bahnen hervorruft.

Wie schon erwähnt, kann die Injektion uni- oder bilateral erfolgen, wobei letzteres bei einmaliger Durchführung (8 µg je Seite) zu massiven Ausfällen führt und dies infolge des motorischen Funktionsverlustes häufig einen letalen Ausgang nimmt (Ungerstedt, 1971). Bei chronischer bilateraler Läsion (4 x 5 µg je Seite) zeigen sich weniger schwerwiegende Zellverluste, sodass hier nur frühe Stadien des IPS untersucht werden könnten und sich das Vollbild des Morbus Parkinson nicht einstellt (Pedersen, 2001). Die unilaterale Läsion ermöglicht einen „Hemiparkinsonismus“ und dadurch quantifizierbare Verhaltenstests bei Ratten (Marshall und Ungerstedt, 1977) und Mäusen (Von Voigtlander et al., 1973). Zugleich bietet sich sozusagen „intraindividuell“ die nicht-läsionierte Hemisphäre als Kontrolle an. Analysiert werden, nach Gabe von Dopaminrezeptoragonisten zum Beispiel Apomorphin, kontralaterale Rotationen oder aber ipsilateral zur Läsion stattfindende Rotationen bei Gabe von Stoffen, die zu einer verstärkten Dopaminausschüttung führen (u.a. Amphetamin). Wobei die Anzahl der durchgeführten Rotationen mit dem Ausmaß des Unterganges dopaminergen Neurone korreliert (Hudson et al., 1993; Grealish et al., 2010) und somit die Auswahl optimal läsionierter Tiere für weitere Forschungen ermöglicht. Anhand eines Vergleiches der Rotationswerte vor und nach Therapieverfahren ist es möglich einen etwaigen Therapieerfolg auszumachen. Neben Rotationsverfahren sind auch der Zylindertest (vgl. 2.4.1), Korridortest, Schrittlängenvergleiche und andere möglich (Iancu et al., 2005; Grealish et al., 2010). Das 6-OHDA-Modell kann für das Versuchstier Ratte als etabliert angesehen werden, doch zeigten die Arbeitsgruppen von Iancu et al. (2005) und Darmopil et al. (2008), dass eine Transition aller bisherigen Erkenntnisse von der Ratte auf die Maus nicht möglich ist. Durch die Gruppe um Iancu wurden Versuche unternommen eine Korrelation zwischen Ergebnissen motorischer Test, wie sie bei Ratten üblich sind, und dem

Einleitung

Verlust dopaminergener Neurone nach 6-OHDA-Injektion in das MFB herzustellen. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Arbeitsgruppen teils recht unterschiedliche Reaktionen bei Gabe von Apomorphin und Amphetamin zur Durchführung von Rotationstests bei Mäusen erhielten. So mussten bei Ratten gebräuchliche Dosierungen zehnfach erhöht werden, um bei Mäusen gleiche Effekte zu bewirken (Iancu et al., 2005). Darmopil et al. zeigten 2008, dass ähnlich wie bei einigen Primaten, auch bei Mäusen Tyrosinhydroxylase-(TH)-positive Zellen im Striatum der Dopamin-depletierten Seite nachzuweisen sind. Diese konnten hier am dritten Tag nach der Läsion beobachtet werden, zeigten anschließend aber eine stetige Verminderung, die unter Gabe von L-DOPA jedoch nicht auftrat.

Es besteht also weiterer Klärungsbedarf, bevor die Maus als 6-OHDA-Modell vollends verstanden und genutzt werden kann.

1.5.2 N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-(MPTP)-Modell

MPTP ist ein Derivat des als „Designerdroge“ verwandten MPPP (1-Methyl-4-phenyl-4-propion-oxy-piperidin). Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften passiert es die Blut-Hirnschranke gut und wird dort von Gliazellen mittels der MAO-B zu 1-Methyl-4-phenyl-1,6-dihydropyridin (MPDP) und 1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium (MPP⁺)-Kation oxidiert (Gerlach et al., 1991; Beal, 2001). Besonders letzterer wird durch seine hohe Affinität zum Dopamintransporter (Bezard et al., 1999) in die Neurone aufgenommen, bindet an Neuromelaninen, akkumuliert und führt durch Blockade des I. Komplexes der Atmungskette zur Entstehung freier Radikaler, was zu schweren Zellschäden und dem Untergang dopaminergener Neurone führt (Tipton und Singer, 1993; Beal, 2001). Der Vorgang läuft, ähnlich wie beim 6-OHDA-Modell, in kurzer Zeit und ohne Auffinden von Lewy-Körperchen ab (Beal, 2001). Es kommt zu einer Degeneration der nigrostriatalen Bahnen mit einer dem IPS ähnlichen Symptomatik (Rigor, Akinese, selten Tremor), wobei dieser Effekt schon bei geringen Dosierungen bei Primaten, jedoch erst unter vergleichsweise hohen Dosen bei Nagern, Schafen und anderen Tieren auftrat (Gerlach et al., 1991). Am gebräuchlichsten ist dieses Modell zur Erforschung neuroprotektiver Wirkstoffe.

Ausgehend vom MPTP wurden auch strukturähnliche Stoffe (Paraquat, Rotenon, uvm.) mit ähnlichen Wirkungen auf den I. Komplex der Atmungskette zur experimentellen Herbeiführung einer Parkinsonsymptomatik gefunden. Sie führten oft

Einleitung

jedoch zu weniger ausgeprägten oder seltener auftretenden Schädigungen, wiesen aber unter anderem Lewy-Körperchen auf (Betarbet et al., 2000; McCormack et al., 2002).

1.5.3 Transgene Tiermodelle

Dieses Modell basiert auf der Existenz seltener genetisch determinierter Parkinsonformen durch Mutationen und Proteinefehlbildungen. Entsprechende Untersuchungen wurden sowohl an Zellkulturen, als auch an Mäusen, Fruchtfliegen und Fadenwürmern durchgeführt, da hier die Verfügbarkeit, Handhabbarkeit und letztlich auch die Generationszeit optimal sind (Dawson et al., 2010). So können D₂-Rezeptor-Knock-Out-Mäuse (Baik et al., 1995), Mäuse- und Fliegenarten mit α -Synuclein-Überexpressionen mit unterschiedlichen Promotoren (u.a. Masliah et al., 2000; Lee et al., 2002; Magen und Chesselet, 2010) oder obig genannte Tiere mit Defekten im LRRK2- (Ross et al., 2006), parkin-, DJ-1- oder PINK1-Gen (West et al., 2007; Dawson et al., 2010) zur Analyse der toxischen Wirkung der Proteinablagerungen und deren zeitliche Entwicklung herangezogen werden, ohne dass es zu nennenswertem Neuronenuntergang kam. Dies ermöglicht einen Einblick in pathophysiologische Abläufe, wie sie auch beim IPS von Interesse sind. Im Gegensatz zu den Toxin-induzierten Modellen sind hier ein chronischer Verlauf und die volle Symptomatik der Parkinsonerkrankung zu beobachten, was den positiven prädiktiven Wert medikamentöser Studien verbessern soll, jedoch, aufgrund der genetischen Determination, neuroprotektive Strategien kaum zum Tragen kommen lässt (Dawson et al., 2010).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit soll das Mausmodell des IPS hinsichtlich der von Iancu und Mitarbeitern (2005) sowie Darmopil und Mitarbeitern (2008) gemachten Beobachtungen (1.5.1) weitergehend analysieren. In der erstgenannten Gruppe stand die Transition motorischer Tests zur Klassifizierung des Zellverlustes in der SN von der Ratte auf die Maus im Mittelpunkt. Bei letzterer Arbeitsgruppe wurden bei unilateral 6-OHDA-läsionierten Mäusen Tyrosinhydroxylase-(TH)-positive Zellen im Striatum der läsionierten Hemisphäre gefunden. TH ist das Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese, gerade dieses Neurotransmitters, an welchem es beim IPS mangelt.

TH-positive Zellen im läsionierten Striatum wurden auch am Modell der Ratte und des Affen beschrieben (Meredith et al., 1999; Betarbet et al., 1997; Ikemoto et al., 1997) und konnten bei verstorbenen Parkinsonpatienten nachgewiesen werden (Ikemoto et al., 1997; Porritt et al., 2000). Phänotypisch konnten bei der Ratte zwei Zelltypen charakterisiert werden. Zum einen bipolare Zellen mit rundem bis ovalem Soma und einem Durchmesser zwischen sechs und zwölf Mikrometer, welche keinerlei dendritische Dornen erkennen ließen und zum anderen bis 15 µm große, multipolare Zellen, die eine deutliche Arborisierung mit ausgeprägten dendritischen Dornen aufwiesen (Lopez-Real et al., 2003). Diese Zellen schienen vorwiegend um die vordere Kommissur nach chronischen und partiellen Läsionen beobachtbar zu sein. Bei maximaler Dopamindepletion dagegen waren bei der Ratte keine TH-positiven Zellen mehr beobachtbar (Lopez-Real et al., 2003).

Durch die Nutzung genetisch modifizierter Mäuse, die grün fluoreszierendes Protein (EGFP) in den entsprechenden Zellen in Abhängigkeit von der TH-Regulatorsequenz bilden, konnte die Arbeitsgruppe um Ibáñez-Sandoval (2010) diese TH-positiven Neurone elektrophysiologisch in insgesamt vier Typen mit unterschiedlichem Widerstand und verschiedenen Entladungsfrequenzen einteilen. Der immunhistochemische Nachweis von Aminosäure-Decarboxylase (neben TH ein weiteres Enzym der Dopaminsynthese; Meredith et al., 1999), Dopamin-Transporter und Glutamat-Decarboxylase (das zentrale Enzym der GABA-Synthese; Betarbet et al., 1997) legt verschiedene neuronale Funktionen dieser als Interneurone gesehener Zellen nahe (Tepper et al., 2010). Diese erscheinen umso wahrscheinlicher, da die TH-positiven Neurone zumindest beim Affen ins Striatum eingebunden sind (Mazloom und Smith, 2006) und bei der Ratte der Nachweis einer

Einleitung

elektrophysiologischen Antwort TH-positiver Neurone auf kortikale Stimulation erbracht werden konnte (Ibáñez-Sandoval et al., 2010). Auch die efferente Verknüpfung dieser Interneurone mit striatalen Projektionsneuronen würde eine Charakterisierung als GABA-erge Interneurone stützen (Ibáñez-Sandoval et al., 2010; Tepper et al., 2010). Masuda et al. (2011) zeigten, dass diese GABA-ergen Neurone mRNA enthalten, welche die Informationen für TH transkribieren und nach Dopamindepletion auch TH exprimieren. Den gleichen genetisch modifizierten Mausstamm wie Ibáñez-Sandoval et al. (2010) nutzend, konnten bei allen TH-positiven Zellen Marker ausgereifter sowie bei einigen dieser Zellen Marker unreifer und migrierender Neurone nachgewiesen werden (Yang et al., 2004; Masuda et al., 2011). Die Herkunft der TH-positiven Neurone scheint aufgrund der dargestellten immunhistochemischen Erkenntnisse (Ibáñez-Sandoval et al., 2010; Tepper et al., 2010; Masuda et al., 2011) dem striataler Projektionsneurone ähnlich zu sein, kann bisher aber nicht bewiesen werden. Die Entstehung durch eine adulte Neurogenese scheint möglich, da zum einen die räumliche Nähe zur subependymalen Zone besteht, in welcher Neurogenese nachgewiesen wurde (Kempermann, 2006), zum anderen eben diese aktive Zone mit einer Erhöhung der Produktion dopaminerger Neurone auf eine Dopamindepletion reagiert (Hoglinger et al., 2004; Tandé et al., 2006).

Zu Recht stellen Tepper et al. (2010) die Frage, ob der Nachweis der genannten Enzyme ausreicht, um diesen Interneuronen eine entsprechende Möglichkeit zur Synthese und Freisetzung von Dopamin zu unterstellen. Dies soll in dieser Arbeit indirekt über die Untersuchung der motorischen Leistung, welche bei Freisetzung von Dopamin beim Krankheitsbild des Parkinsons zu vermuten wäre, ergründet werden.

Hier sollen motorische Tests am Modell der 6-OHDA-Maus weiter etabliert werden indem die von Darmopil et al. beobachteten TH-positiven Zellen neben ihrer Entstehung besonders auf funktionelle Auswirkungen und Zellzahl untersucht werden.

Folgende Fragen sind Grundlage dieser Arbeit:

1. Handelt es sich bei den TH-positiven Neuronen um nach der Läsion in der ausgewachsenen Maus neu gebildete Zellen im Sinne einer adulten

Einleitung

Neurogenese oder wandeln sich bestehende Neurone um, wie am Modell der Ratte und des Affen beschrieben?

2. Wann sind diese Zellen nach der Läsion nachweisbar?
3. Wie viele Zellen sind es zum Zeitpunkt der ersten Nachweisbarkeit und nach einer Zeitspanne von 90 Tagen?
4. Hat das Vorhandensein dieser Zellen eine motorisch-funktionelle Konsequenz im Sinne einer besseren motorischen Leistung? In wieweit sind Übereinstimmungen zwischen Zellzahl und motorischer Leistung festzustellen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde Mäusen sieben Tage, beginnend drei Tage vor Läsion, der Zellproliferationsmarker Bromdesoxyuridin (BrdU) intraperitoneal injiziert. BrdU wird in die DNS sich teilender Zellen inkorporiert und kann in diesem Versuch bei Co-Lokalisation mit TH die adulte Neurogenese belegen. Die Versuchstiere wurden mittels stereotaktischer 6-OHDA-Gabe in das MFB läsioniert. Eine Woche nach der Läsion wurden bei einer Gruppe der Tiere die Hirne entnommen, perfundiert, geschnitten, immunhistochemisch mit Darstellung TH- und BrdU-positiver Zellen aufgearbeitet und anschließend stereologisch ausgewertet. Die verbliebene Gruppe wurde alle 30 Tage dem Zylindertest und dem „Apomorphin-induzierten-Rotationstest“ unterzogen. Nach 90 Tagen wurde nach dem gleichen Schema wie bei der ersten Gruppe mit der Aufarbeitung der Gehirne verfahren.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Tierhaltung

Untersucht wurden 17 zwischen sechs und acht Wochen alte, männliche C57BL/6-Mäuse. Das Körpergewicht betrug zum Zeitpunkt der 6-OHDA-Läsion ca. 23 g. Die Tiere wurden in Gruppen zu fünf in Makrolonkäfigen (720 cm² Grundfläche) bei 20 ± 2°C unter künstlichem, zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus mit freiem Zugang zu hochkalorischem sowie Standardfutter (Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser gehalten. Um die Motorik sowie die Zahl der gegen BrdU/TH angefärbten Zellen und deren Kerne im zeitlichen Verlauf beurteilen zu können, wurden die Mäuse in zwei Versuchsgruppen zu neun und acht Tieren geteilt.

Die Haltung und die Experimente erfolgten gemäß geltender tierschutzrechtlicher Bestimmungen und behördlicher Auflagen im Tierstall und Tierlabor des Institutes für Anatomie der Universität Rostock.

2.2 Bromdesoxyuridin-(BrdU)-Gabe

Alle Tiere erhielten zum Zwecke eines in vivo Proliferationsnachweises über einen Zeitraum von sieben Tagen eine tägliche BrdU-Injektion (100 mg/kg KG, intraperitoneal) beginnend drei Tage vor der 6-OHDA-Läsion. Zur Herstellung der BrdU-Lösung wurden 100 mg BrdU in 4,5 ml Kochsalzlösung (0,9%) gemischt. Anschließend wurde das Gemisch solange mit Natriumhydroxidlösung (2 N) titriert, bis sich das BrdU komplett löste. Danach wurde auf 5 ml mit Kochsalzlösung (0,9%) aufgefüllt.

2.3 Unilaterale 6-Hydroxydopamin-(6-OHDA)-Läsion

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit „Mausmix“ (10 ml/kg KG; bestehend aus: 2,5 ml Xylazin/Rompun®, Bayer, Deutschland und 7,5 ml Ketamin, Bela Pharm, Vechta, Deutschland in 90 ml 0,9% NaCl) anästhesiert. Anschließend wurde der Kopf in einem Mausadapter (Kopf, Tujunga, CA, USA) in der horizontalen „flat-scall“-Position fixiert. Dies wurde durch das Einführen von zwei Metallstiften in den äußeren Gehörgang der Tiere ermöglicht, außerdem diente ein Metallbügel über der Nase zur weiteren Fixierung. Es folgte eine etwa ein Zentimeter lange, sagittale Inzision zur Darstellung der Suturæ coronalis et sagittalis zum Auffinden des Bregmapunktes. In Bezug zum Bregma wurden die folgenden Koordinaten zur

Material und Methoden

Ermittlung der Injektionsstelle genutzt (Paxinos und Franklin, 2001): AP -1,2; L -1,1; V -5 (Dura). Ziel der Injektion war das rechte mediale Vorderhirnbündel in der die nigrostriatale Faserbahn (rMFB) verläuft. Nach Überprüfung der Zielkoordinaten erfolgte eine kleinflächige Schädeltrepanation (ca. 1-2 mm²) mittels eines Handstückbohrers (Reco Dental, Wiesbaden, Deutschland) und anschließende Eröffnung der Dura mater mit einem feinen Skalpell. Knochenfragmente der Trepanation sowie die entstandene Wundfläche wurden mit steriler Kochsalzlösung gespült. Nun konnte unter Zuhilfenahme einer Halterung eine 5 µl-Hamiltonspritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) in die angegebene Tiefe bis zum rMFB geführt werden. Nach einer Minute Wartezeit begann die Injektion von 2 µl 6-Hydroxydopaminhydrochlorid-Lösung (2,5 µg/µl 6-OHDA-HCL (Sigma) in 0,2 mg/ml Ascorbinsäure-0,9% NaCl-Lösung) über einen Zeitraum von 4 Minuten. Nach weiteren 5 Minuten wurde die Hamiltonspritze langsam entfernt und die Haut über der Trepanationsstelle durch Wundklammern (MICHEL 7,5 x 1,75 mm) geschlossen. Anschließend erfolgte eine Verbringung der Tiere unter eine Wärmelampe, mit stetiger Kontrolle, bis zum Aufwachen aus der Narkose.

2.4 Tierverhaltensexperimente

2.4.1 Zylindertest

Dieser Test dient zur Ermittlung der Präferenz bei der Benutzung der Vorderpfoten zur Erkundung der Umwelt bei unilateral läsierten oder bilateral läsierten und anschließend unilateral transplantierten Tieren und erfolgte in der modifizierten Form nach Schallert und Tillerson (1999). Grundlage bildet hier die instinktive Erkundung einer neuen Umwelt mit der Nase und den Vorderpfoten ohne Notwendigkeit eines weiteren Stimulus. Als Testsetting (Abb. 2) werden ein mit wenig Streu gefüllter Glaszylinder sowie zwei orthogonal zueinander ausgerichtete Spiegel, welche hinter dem Zylinder positioniert werden, benötigt, um auch vom Untersucher abgewandte Bewegungen zu erkennen. Zur Aufzeichnung und zeitlich modulierten Wiedergabe des Tests wurde des Weiteren ein Kamerasystem (JVD, Festplatten-Camcorder, Modell „Everio“) genutzt. Es wurde die zweite Gruppe (n = 8; 3 Monate postlesionem) monatlich und eine Kontrollgruppe gleich alter, gesunder Mäuse (n = 8) diesem Test unterzogen. Da die erste Gruppe (n = 9; 3 Tage postlesionem) im dreitägigen Zeitraum nicht in der Lage ist den Test aktiv zu bewältigen, liegen von selbiger keine Ergebnisse vor. Die ersten 30 Wandberührungen mit den Vorderpfoten wurden von

jedem Tier ermittelt und nach ipsilateral (läsioniert) und kontralateral (nicht-läsioniert) erfasst sowie dem Verhältnis zueinander ausgerechnet.

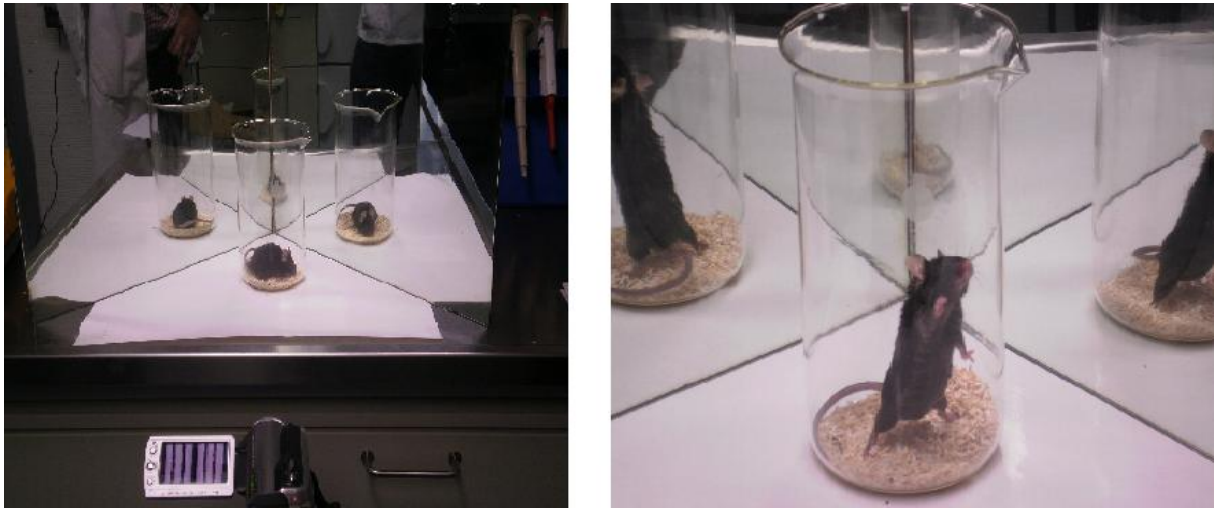


Abb. 2) Exemplarische Darstellung des Zylindertests.

Links ist eine Übersicht der Experimentieranordnung des Zylindertests zu sehen. Die Spiegel dienen der Einsicht des Zylinders von allen Seiten. Rechts ist beispielhaft eine entsprechend positiv zu wertende Benutzung der rechten Vorderpfote zu sehen.

2.4.2 Apomorphin-Rotationstest

Apomorphin ist ein nicht selektiver Dopamin D_1/D_2 -Rezeptoragonist und bewirkt bei einseitig deafferentierten Ratten (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970) und Mäusen (Iancu et al., 2005; Grealish et al., 2010) ein in Bezug zur läsionierten Hemisphäre kontralaterales Rotationsverhalten, sodass ein rechtsseitig läsioniertes Tier nach links rotiert. Nach Grealish et al. (2010) findet sich, bei entsprechend niedrig gewählter Dosis, eine Korrelation zwischen dem Ausmaß des Verlustes nigrostriataler dopaminergener Neuronen und dem Rotationsverhalten, sodass ab sechs Nettorotationen je Minute von einem Verlust von mehr als 80% der genannten Neurone auszugehen ist. Nach 30, 60 und 90 Tagen wurden die Mäuse der zweiten Gruppe ($n = 8$; 3 Monate postlesionem) sowie eine gesunde Kontrollgruppe gleich alter Mäuse ($n = 8$) diesem Test unterzogen. Es wurde Apomorphin (1 mg/kg KG; Teclapharm, Lüneburg, Deutschland) subkutan in die Nackenregion injiziert und ein Magnet (Ugo Basile, Italien), zur elektronischen Messung der Rotationen, am Tier mit Klebeband befestigt. Anschließend wurde die Maus für 40 Minuten in ein Rotometer (Abb. 3, Ugo Basile, Italien) gesetzt, welches jede volle Rotation in ipsi- und kontralaterale Richtung aufzeichnete.

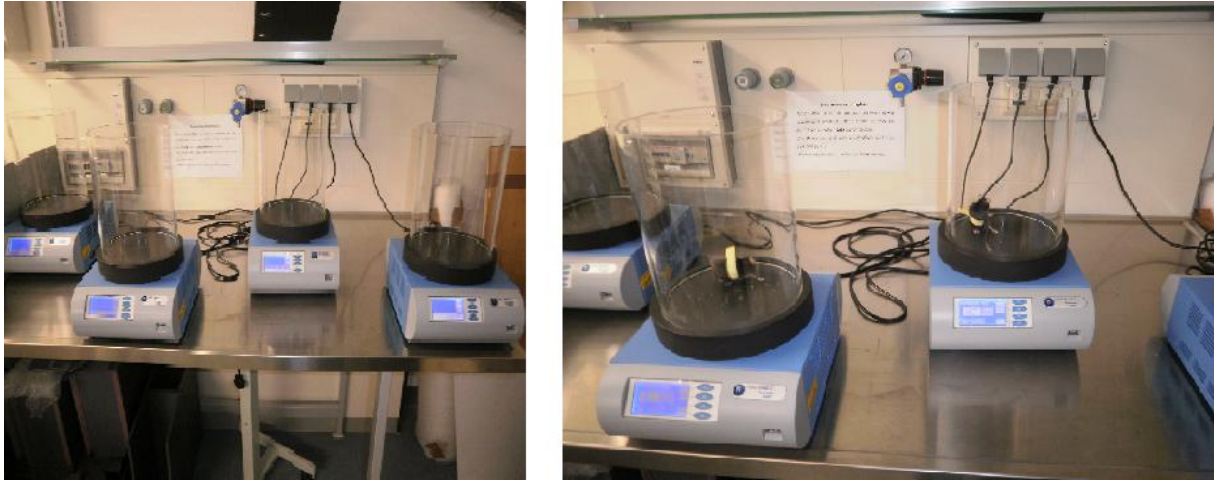


Abb. 3) Übersicht eines Rotometerarbeitsplatzes.

Darstellung des Rotometerarbeitsplatzes mit den genutzten Geräten links. Rechts sind rotierende läsionierte Mäuse zu sehen. Das gelbe Tape dient dabei der Fixierung des Magneten.

2.5 Perfusion und Gehirnentnahme, Aufarbeitung der Gehirne

Nach drei Tagen und drei Monaten wurde je eine Gruppe wie im Folgenden beschrieben perfundiert: Die Tiere wurden mit einer intraperitoneale Gabe von Pentobarbital- Na^+ (80 mg/kg KG, Sigma) getötet, worauf anschließend der Thorax und der Perikardbeutel mit einer spitzen Schere eröffnet wurden. Nun konnte der linke Ventrikel apexnahe inzidiert werden, sodass eine Kanüle in den Ventrikel verbracht und dort fixiert werden konnte. Um den Blutabfluss zu gewährleisten war ebenfalls die Eröffnung des rechten Atriums notwendig. Nach den genannten Maßnahmen im zirkulatorischen System erfolgte die Vorspülung durch ein Pumpensystem (Ismatec SA ITC Laboratoriumstechnik, Zürich, Schweiz) mit 5 ml einer auf 4°C temperierten 0,9%-igen Kochsalzlösung, woran sich die Perfusionsspülung mit 40 ml ebenfalls niedertemperierter 4%-iger Paraformaldehydlösung (gelöst in 0,1 M PBS, pH 7,4) anschloss. Nach Dekapitation und Hirnentnahme wurden diese über Nacht in 4%-iger Perfusionslösung bei 4°C immersionsfixiert und anschließend zur Kryoprotektion und Entwässerung über Nacht bei 4°C in 20%-ige Saccharoselösung (gelöst in 0,1 M PBS, pH 7,4) gelagert. Nach vollständigem Absinken der Hirne wurden diese in -50°C temperiertem Isopentan (Roth) gefroren und anschließend in Metallfolie gewickelt bei -80°C gelagert.

Mit einem Kryostaten (Jung CM3000, Leica, Bensheim, Deutschland) wurden bei einer Kammertemperatur von -21°C 30 µm dicke 6er-Parallelschnittserien angefertigt und in 24-Well-Platten (Nunc, Deutschland) in 0,1 M PBS (pH 7,4) zur anschließenden Nissl-Färbung (Serie I) bzw. zur späteren immunhistochemischen

Material und Methoden

Färbung (Serie II) in 96-Well-Platten (Greiner, Deutschland) ins Einfriermedium (126 ml 87% Glycerol und 150 ml Ethylenglycol in 250 ml Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4) überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Verfahren wurden als sogenanntes „Doppelmarkierungsverfahren“ wie in 2.6.4 beschrieben mit der zweiten Parallelschnittserie durchgeführt. Von besonderem Interesse für diese Arbeit war das Striatum, sodass für die Färbung mit den Schnitten gearbeitet wurde, welche sich ab der anatomischen Landmarke des vollständig dargestellten Corpus callosum befanden.

2.6.1 Verwendete Antikörper

Antikörper (Herkunft/Spezies)	Antigen	Verdünnung	Hersteller
Anti-BrdU (Ratte)	BrdU	1:500	AbD Serotec
Anti-TH (Schaf)	dopaminerge und adrenerge Neurone	1:1000	Chemicon
Biotinyliertes Anti- Ratte (Hase)	AK aus Ratte	1:200	Vector
Biotinyliertes Anti- Schaf (Hase)	AK aus Schaf	1:200	Vector

2.6.2. Primärantikörper

2.6.2.1 Bromdesoxyuridinmarkierung (BrdU)

BrdU ist ein Thymidin- bzw. Desoxyuridin-Analogon und somit in der Lage nach Inkorporation in vitalen, proliferierenden Zellen während der S-Phase des Zellzyklus in die DNS eingebaut zu werden. Die Markierung proliferierender Zellen mittels BrdU findet insbesondere bei Untersuchungen bzgl. der Neurogenese Anwendung (Kuhn und Cooper-Kuhn, 2007; Landgren und Curtis, 2011). Der Nachweis von BrdU durch Antikörper zeigt, dass die entsprechende Zelle aus der Teilung einer anderen, welche BrdU inkorporierte, abstammt.

Zur Applikation des BrdU wurde verfahren wie in 2.2 dargestellt. Die Detektion des inkorporierten BrdU erfolgte in einer 1:500 Verdünnung mit Anti-BrdU (aus Ratte, AbD Serotec).

2.6.2.2 Tyrosinhydroxylasemarkierung (TH)

TH ist das Schrittmacherenzym der Katecholaminsynthese. Es katalysiert die Hydroxylierung des L-Tyrosins zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) (Di Porzio et al., 1990; Betarbet et al., 1997). Dieses tetramerische Protein besteht aus vier identischen Untereinheiten und weist in seiner Gesamtheit ein Molekulargewicht zwischen 60 und 68 kDa auf (Meyers et al., 1996). Es wird üblicherweise mit dopaminergen Neuronen assoziiert, welche sich in erster Linie im ZNS und Nebennierenmark befinden (Andreeva et al., 1996). Da die Erbinformation für dieses Enzym nur auf einem Gen kodiert ist, liegen keine Isoenzyme bei den meisten Spezies vor. Eine Ausnahme davon bildet die Gruppe der Primaten, da hier durch die Möglichkeit des alternativen Spleißens bis zu vier Isoenzyme möglich sind (Haycock, 2002). Das Zielepitop des Antikörpers ist die N-terminale Region des Enzyms, so kommen Somata, Axone und Zellausläufer zur Darstellung.

In unseren Untersuchungen wurde Anti-TH (aus Schaf, Chemicon) in einer Verdünnung von 1:1000 genutzt.

2.6.3 Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper dienen der lichtmikroskopischen Visualisierung der primär eingesetzten Antikörper und dadurch auch der durch letztere markierten Strukturen. Die Notwendigkeit ergibt sich daraus, dass die epitopmarkierenden Erstantikörper nicht sichtbar sind. Nach der spezifischen Bindung des ersten Antikörpers folgt eine gründliche Waschung des zu untersuchenden Gewebes, sodass davon ausgegangen werden kann, dass nur noch epitopgebundene Primärantikörper vorliegen. Anschließend erfolgt die zweite Antikörper-Reaktion zur Bindung an den artspezifischen Anteil des Primärantikörpers. Im Allgemeinen können Zweitantikörper mit einem Enzym oder einem Fluoreszenzfarbstoff zum Zwecke der Visualisierung gekoppelt sein. Wenn der Antikörper enzymgekoppelt ist, macht man sich eine Enzymsubstratreaktion zu Nutze, in welcher entweder das Substrat einen Farbumschlag bewirkt oder aber durch andere Methoden quantifizierbar wird. Bei

Material und Methoden

letzterer erfolgt durch Anregung mit Licht spezifischer Wellenlänge eine mittels Fluoreszenzmikroskop detektierbare Lumineszenz.

Bei dieser Untersuchung wurden biotinylierte Antikörper aus Detektionskits gegen Ratte beziehungsweise Schaf in einer Verdünnung von 1:200 genutzt (Vectastain®, Vector, Burlingame, CA, USA). Biotin ist ein Co-Enzym bei Carboxylierungen, welches in seiner aktiven Form kovalent an das entsprechende Enzym gebunden ist. So erfolgt nach Bindung des Zweitantikörpers an den Erstantikörper die Zugabe eines Reagenz', das Avidin und Peroxidase enthält. Es kommt zur Bildung großer Komplexe zwischen Avidin, Biotin und Peroxidase. Durch die Vierbindigkeit des Avidins für Biotin kommt es zu einer Signalverstärkung. Zur optischen Darstellung gelangt der Komplex durch die Reaktion der Peroxidase mit einem Chromogen, wie dem hier genutzten Diaminobenzidin (DAB), welches durch die Oxidation zum Farbumschlag gebracht wird (Hsu et al., 1981 a, b).

2.6.4 Protokoll BrdU-TH-Doppelmarkierung

Nach Entnahme der Hirnschnitte aus der Kryoprotektionslösung folgte eine zehnminütige Waschung in PBS und anschließender Behandlung mit 3% H₂O₂, welches darauf durch zweimalige Waschung mit PBS wieder entfernt wurde. Um dem Primärantikörper den Zugang zum BrdU in der DNS zu ermöglichen, ist eine vorherige DANN-Denaturierung wie folgt nötig:

Die Schnitte werden für zwei Stunden bei 65°C in einer Lösung aus 50% Formamid und doppelt konzentriertem SSC-Puffer belassen und danach erneut in doppelt konzentriertem SSC-Puffer bei Raumtemperatur für 5 Minuten überführt. Es folgen weitere 30 Minuten in 2 M HCl bei 37°C und anschließend zehn Minuten in 0,1 M Borsäure, welche auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt wurde. Zum Abschluss der Denaturierung erfolgt die dreimalige Waschung zu je zehn Minuten in PBS.

Noch vor der Inkubation mit dem ersten Primärantikörper ist ein Blocken unspezifischer Bindungsstellen nötig, um Hintergrundsignale bei der späteren Auswertung zu minimieren. Dies erfolgt durch einstündige Reaktion mit 0,05% Triton X – 100 und 3% „normal rabbit serum“ (NRS, Vector) gelöst in PBS (nachfolgend als Abblocklösung bezeichnet). Direkt nach dem Blockierungsvorgang folgte die Primärantikörperinkubation über Nacht bei 4°C in einer Lösung aus 0,025% Triton X – 100, 1% NRS (im Folgenden als Antikörperstammlösung bezeichnet) und Anti-

Material und Methoden

BrdU (aus Ratte, Verdünnung 1:500, AbD Serotec, Kidlington, UK) in PBS. Nach anschließendem dreimaligem Waschen in PBS für je fünf Minuten folgte die Inkubation mit dem in der Antikörperstammlösung 1:200 verdünnten biotinyliertem Anti-Ratte-AK (aus Hase, Vector, Burlingame, CA, USA) für zwei Stunden. Nach der Inkubation wurde erneut drei mal zehn Minuten mit PBS gewaschen. Zur in 2.6.3 dargestellten Visualisierung wurden die Lösungen des ABC-Detektorkits 1:50 verdünnt und 30 Minuten zur Reaktion belassen, bevor die Hirnschnitte überführt wurden, um eine weitere Stunde in der ABC-Lösung zu inkubieren. Durch dreimaliges Waschen à zehn Minuten in PBS wurden die Schnitte für die anschließende DAB-Fällung vorbereitet. Für den Farbumschlag zur BrdU-Detektion wurde schwarzfällendes DAB genutzt. Zur Herstellung der Fälllösung wurden 3% Chromogen und 3% H₂O₂ in PBS gelöst, um nachfolgend die Schnitte etwa drei Minuten reagieren zu lassen. Die genaue Reaktionsdauer hing von der Färbung der Gewebeschnitte ab und wurde mittels Lichtmikroskop während der Reaktion kontrolliert. Um die DAB-Fällung zu beenden wurden die Schnitte drei mal zehn Minuten gewaschen.

Die TH-Markierung wurde an den schon gegen BrdU markierten Hirnschnitten durchgeführt, um so die Doppelmarkierung, also die Darstellung zweier Epitope auf einem histologischen Schnitt, zu ermöglichen. Zur Detektion TH-positiver Zellen wurde analog mit den entsprechenden Antikörpern verfahren:

Es erfolgte das Blocken mittels Blockierungslösung für eine Stunde, gefolgt von der Primärantikörperinkubation über Nacht bei 4°C in einer Lösung aus Antikörperstammlösung und Anti-TH-AK (aus Schaf, Verdünnung 1:1000, Chemicon jetzt Millipore, Billerica, MA, USA). Anschließend wurde ungebundener Primärantikörper durch drei mal fünf-minütiges Waschen entfernt, um der Sekundärantikörperinkubation zugeführt zu werden. Die Inkubation wurde über zwei Stunden in Antikörperstammlösung mit biotinyliertem Anti-Schaf-AK (aus Hase, Verdünnung 1:200 Vector, Burlingame, CA, USA) vollzogen. Es folgt, unter Einhaltung der gleichen Konzentrationen und Zeiten wie beim ersten Epitop, eine Waschung vor und nach der Reaktion mit dem ABC-Komplex. Für die DAB-Fällung wurde jetzt braunfällendes DAB gewählt, um eine Differenzierung beider Epitope zu ermöglichen. Hierzu wurden 10 mg kristallines DAB in 100 ml PBS versetzt mit 1 µl

Material und Methoden

H₂O₂ gelöst. Die Hirnschnitte wurden für ca. zehn Minuten in der Lösung belassen, auch hier erfolgte wieder eine lichtmikroskopische Kontrolle, bevor durch eine zehnminütige Waschung in PBS die Reaktion beendet wurde.

Abschließend erfolgte noch eine Waschung für fünf Minuten in Aqua destillata, um danach alle Schnitte frei flottierend auf Objektträger aufzuziehen und über Nacht trocknen zu lassen. Die Objektträger wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol gezogen sowie abschließend mit Vitro Clud® nach Herstellerangabe eingedeckt.

2.7 Auswertung und Dokumentation der immunhistochemischen Präparate

Um sowohl TH-positive, BrdU-positive als auch doppelt markierte Zellen zu quantifizieren, wurde ein PC-gekoppeltes Mikroskopsystem genutzt (Olympus BX51, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland), welches über einen dreiachsigen, motorisierten Objektisch (LUDL Electronic Products Ltd., Hawthorne, NY, USA) verfügt. Das Mikroskop wurde vom PC durch das stereologischen Auswertungsprogramm Stereo Investigator angesteuert (Version 8.21.6 32-bit, MBF-Bioscience, Williston, VT, USA). Mit dieser Konfiguration wurden auch die Bilddaten erzeugt.

Zur quantitativen Bestimmung der Zellzahlen wurde die „optical fractionator“-Methode angewendet (West et al., 1996). Vor der eigentlichen Zählung wurde in den histologischen Schnitten zunächst mit einer Übersichtsvergrößerung (2x/00,6 PlanN; ∞/-/FN22) das gesamte Striatum markiert. Die Zählparameter wurden für alle ausgewerteten Schnitte konstant gehalten (Zählgittergröße: 300 x 240 µm², Zählrahmengröße: 90 x 90 µm²). Aufgrund der histologischen Verarbeitung schrumpfen die ursprünglich 30 µm dicken Kryostatschnitte auf 14 µm. Der Sicherheitsabstand („guardzone“) zur Schnittoberseite und -unterseite beträgt jeweils 1 µm, so dass 12 µm Schnittstärke zur Auswertung verbleiben. Als Zählkriterien wurden die Zellidentifikation und ein charakteristischer Punkt der identifizierten Zelle verwendet. Nur eindeutig identifizierbare Zellen deren charakteristischer Punkt im Zählrahmen lag, wurden erfasst. Die Zellzählung erfolgte mit dem 60x Objektiv (60x/0,9 UPlanFLN; ∞/0,11-0,23/FN26,5). Als TH-positiv wurden alle Zellen bewertet deren Zytoplasma entsprechend der DAB-Fällung (2.6.4) deutlich homogen braun

Material und Methoden

gefärbt war, der Zellkern jedoch ausgespart wurde. Eine BrdU-positiv identifizierte Zelle wies einen schwarz markierten Nucleus in entsprechender Form, bei nicht schwarz angefärbtem Zytoplasma auf. Entsprechend wäre das Erscheinungsbild einer TH- und BrdU-positiven Zelle gekennzeichnet durch ein homogen braun angefärbtes Zytoplasma bei deutlich schwarzer Markierung des Zellkerns.

Um die statistische Signifikanz zwischen den ermittelten Zellzahlen zu bestimmen wurden der Wilcoxon-Test und der nicht-parametrische U-Test von Mann und Whitney gewählt, da die Stichprobe (Anzahl der Tiere) relativ klein und daher die Verteilung der BrdU- und TH-positiven Zellzahl in der Grundgesamtheit unbekannt ist. Als unabhängige Stichproben wurden jeweils die Zahl der BrdU-positiven Zellen der läsionierten Hemisphäre nach drei Tagen und drei Monaten, die Zahl der BrdU-positiven Zellen der nicht-läsionierten Hemisphäre nach drei Tagen und drei Monaten sowie die Zahl der TH-positiven Zellen der läsionierten Hemisphäre nach drei Tagen und drei Monaten verglichen.

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Zylindertest

Es zeigte sich im Zylindertest, dass die acht Tiere der zweiten Versuchsgruppe eine deutliche Seitenpräferenz für die Nutzung der rechten Pfote zur Erkundung der Umgebung über einen Zeitraum von drei Monaten aufwiesen. Bei gesunden Kontrolltieren ist eine etwa gleichhäufige Benutzung beider Vorderpfoten bei konsekutiver Beobachtung von 30 Benutzungen festzustellen (Iancu et al., 2005; Hovakimyan et al., 2006).

In Abbildung 4 sind die relativen Benutzungen der linken Vorderpfote bei 30 konsekutiven Wandberührungen im Verlauf von drei Monaten dargestellt sowie die einer entsprechend alten, gesunden Kontrollgruppe. Es handelt sich um die gerundeten, gemittelten und mit der entsprechenden Standardabweichung dargestellten Werte der zweiten Versuchsgruppe, welche sowohl in der entsprechenden Säule, als auch tabellarisch im Anhang ausgewiesen sind. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchstiere sind ebenfalls im Anhang gelistet.

Dieser Test diente zum einen zur Auswahl der Tiere, die für die immunhistochemische Aufarbeitung bestimmt waren, da die Läsion hier als erfolgreich angesehen werden konnte (Iancu et al., 2005; Grealish et al., 2010) und zum anderen zur Beurteilung der motorischen Leistung.

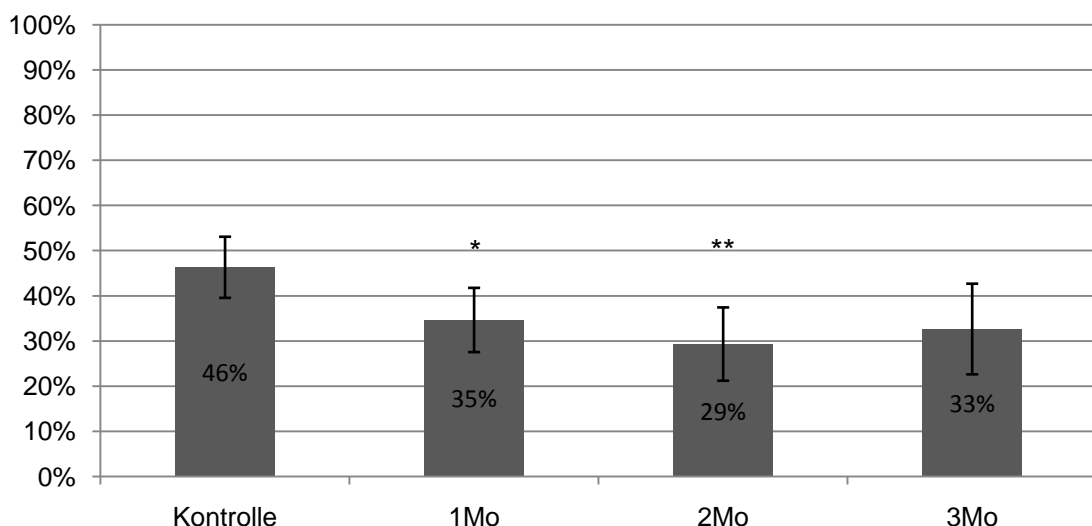


Abb. 4) Ergebnisse des Zylindertests.

Dargestellt sind, als relative Werte, die Mittelwerte mit Standardabweichung, der Benutzung der linken Vorderpfote der rechts-halbseitig läsierten zweiten Tiergruppe nach einem, zwei und drei Monaten postlesionem im Zylindertest sowie entsprechende Daten der Pfortennutzung gesunder, drei Monate alter, Kontrolltiere. Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe von $*=0,008$ und $**=0,003$ im U-Test. Die Anzahl der Versuchstiere umfasste $n_{1Mo, 2Mo, 3Mo}=8$ sowie $n_{Kontrolle}=8$.

Ergebnisse

3.2 Apomorphin-Rotationstest

Im Apomorphin-Rotationstest ist zu sehen, dass die acht Mäuse der zweiten Versuchsgruppe schon einen Monat nach der Läsion ein deutliches, kontralaterales Rotationsverhalten zeigen. Die Zahl der Nettorotationen je Minute nimmt im Laufe des Beobachtungszeitraums von drei Monaten zu, wobei die markanteste Zunahme zwischen dem ersten und zweiten Monat stattfindet. Zum dritten Monat findet ein weiterer, jedoch geringerer Anstieg der Rotationswerte statt, welcher sich vom Rotationswerte des zweiten Monats nicht signifikant unterscheidet. Gesunde Kontrolltiere zeigen dagegen kein deutliches Rotationsverhalten, sodass sich die Nettorotationszahl je Minute einem Wert von Null annähert.

Die Abbildung 5 zeigt die Entwicklung des gerundeten und mit Standardabweichung versehenen Mittelwertes der Nettorotationswerte je Minute der Tiere aus der zweiten Versuchsgruppe über drei Monate und einer Kontrollgruppe zwei Monate alter nicht läsionierter Mäuse. Die Werte der einzelnen Versuchstiere sind dem Tabellenanhang zu entnehmen.

Wie auch schon der Zylindertest sollten die Versuchsergebnisse sowohl die Auswahl der Tiere zur immunhistochemischen Aufarbeitung ermöglichen (Iancu et al., 2005; Grealish et al., 2010), als auch als sensibler Test zur Beurteilung der motorischen Leistung dienen.

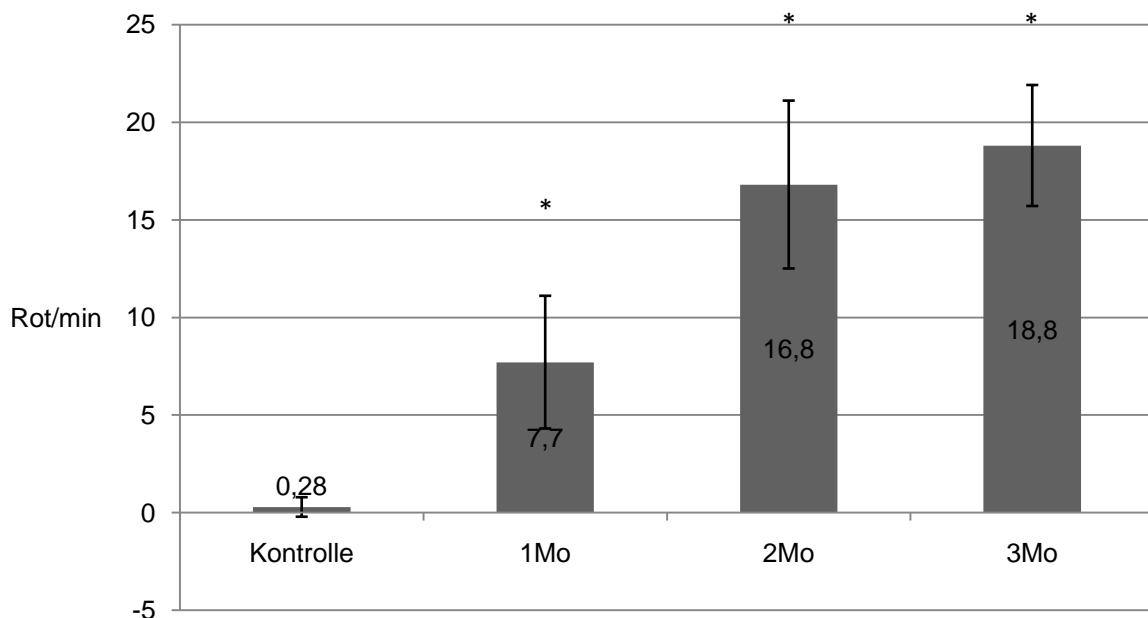


Abb. 5) Ergebnisse des Apomorphin-Rotationstests.

Zu sehen sind die gemittelten und mit Standardabweichung versehenen, absoluten, kontralateralen Nettorotationen je Minute einer Gruppe zwei Monate alter, gesunder Kontrolltiere und der rechts-halbseitig läsionierten zweiten Tiergruppe nach einem, zwei und drei Monaten postlesionem im Apomorphin-Rotationstest. Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe von $*=0,002$ im U-Test. Die Anzahl der Versuchstiere umfasste $n_{1Mo, 2Mo, 3Mo}=8$ sowie $n_{Kontrolle}=6$.

Ergebnisse

3.3 Immunhistochemie – BrdU/TH-Doppelfärbung

Bereits nach Durchführung des ersten Teils des unter 2.6.4 dargestellten Protokolls, der immunhistochemischen Färbung gegen inkorporiertes Bromdesoxyuridin (BrdU), zeigt sich sowohl bei den Tieren der ersten als auch bei denen der zweiten Versuchsgruppe eine deutliche und homogene periventrikuläre schwarze Färbung bei den Hirnschnitten durch das Striatum (Abb. 6 und 7, je A und B). Die schwarz dargestellten und damit BrdU-inkorporierenden Zellen sind neurogene Vorläuferzellen der Subventrikulärzone (SVZ) (Kempermann, 2006), was für die erfolgreiche Durchführung der Färbung spricht. Neben der periventrikulären Darstellung von BrdU, kann dieses auch in striatalen Zellen der läsierten und intakten Hemisphäre nachgewiesen werden (Abb. 6 B und 7 B/C). Im zweiten Schritt des Protokolls 2.6.4 erfolgte die Darstellung Tyrosinhydroxylase (TH)-positiver Strukturen an den schon gegen BrdU gefärbten Hirnschnitten. Wie in Abb. 6 und 7 dargestellt, sieht man eine einseitig deutlich betonte, braune Färbung des Striatums. Sie ist bei Tieren beider Gruppen homogen (bei den Tieren der zweiten Versuchsgruppe stärker, als bei denen der ersten) und wird lediglich durch Striae medullares unterbrochen. Die Lokalisation und Struktur der braunen (TH-positiven) immunhistochemischen Färbung zeigt, dass die hellere (TH-negative) Hemisphäre der Tiere läsiert ist und die Färbung erfolgreich durchgeführt wurde. Ein weiterer Nachweis der dopaminergen Deafferentierung findet sich in der Substantia nigra pars compacta (SNc) in den Abb. 9 bis 11. Hier ist bei den Tieren, welche drei Tage nach der Läsion untersucht wurden, eine klare Minderung der TH-positiven Neurone auf der läsierten Hemisphäre zu sehen (Abb. 8). Mäuse die nach drei Monaten untersucht wurden zeigen sogar einen fast vollständigen Verlust dopaminergener Neurone in der läsierten SN (Abb. 10).

Die statistische Ermittlung der Anzahl BrdU- und/oder TH-positiver Zellen im Striatum (wie unter 2.7 beschrieben) zeigt, dass es weder drei Tage noch drei Monate nach der Läsion doppelt markierte Neurone gibt. Die Menge der BrdU-positiven Zellen im Striatum der läsierten Hemisphäre vermindert sich von durchschnittlich 40031 ± 5640 drei Tage postlesionem auf 18020 ± 1736 nach drei Monaten. Dies ist ein im U-Test mit $p = 0,004$ signifikanter Unterschied (Abb. 12). Die Anzahl TH-positiver Neurone im Striatum dagegen weist mit 5207 ± 662 bei den Tieren der Versuchsgruppe drei Tage nach der Läsion und mit 4421 ± 517 bei denen drei

Ergebnisse

Monate nach der Läsion keine signifikante Differenz ($p = 0,541$ im U-Test) auf. In der intakten Hemisphäre wurden keine TH-immunreaktiven Neurone beobachtet. Vergleicht man BrdU-positive Zellen im Striatum der nicht-läsionierten Hemisphäre bei läsionierten Tieren nach drei Tagen und drei Monaten, sieht man, dass deren Zellzahl mit 5953 ± 573 und 5731 ± 2079 etwa konstant bleibt. Der Fehlerquotient der durchgeführten Statistik liegt bei einem Wert von 0,1.

Die Daten der am Mikroskop ermittelten Stichproben jedes histologischen Frontalschnittes befinden sich in tabellarischer Form im Anhang.

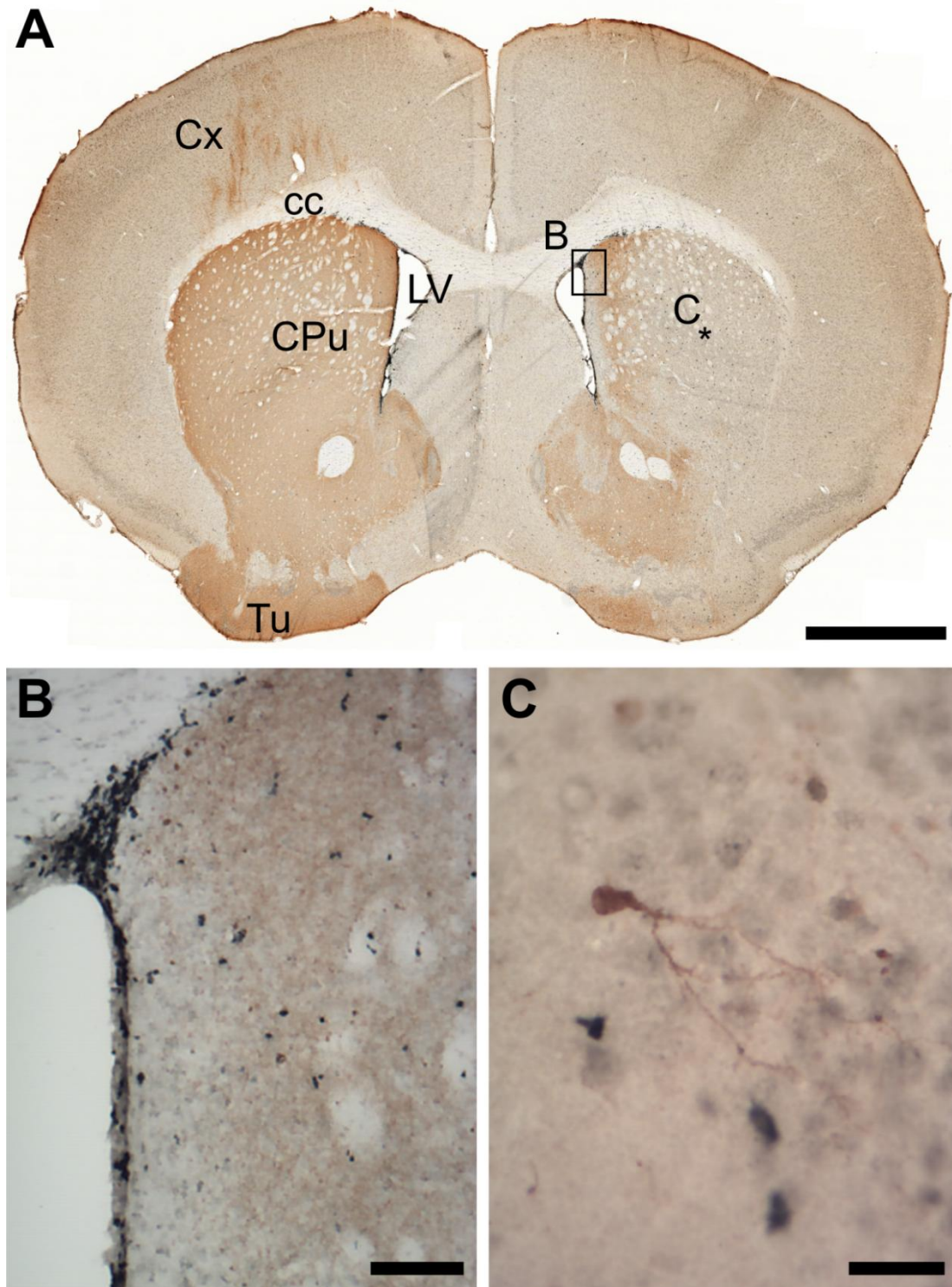


Abb. 6) Immun histochemischer TH- und BrdU-Nachweis am Frontalschnitt durch das Striatum einer unilateral läsi onierten Maus drei Tage postlesionem.

In der Übersicht A ist der Unterschied zwischen läsi onierter (rechts) und kontralateraler nicht-läsi onierter Hemisphäre zu sehen. Die braun dargestellten, TH-positiven Fasern sind bereits drei Tage nach Läsion in der rechten Hemisphäre sichtbar zurückgegangen. Abbildung B zeigt die hohe Anzahl BrdU-positiver Zellkerne (schwarz) im dopaminerg deafferentierten CPu, sowie als Positivkontrolle Zellkerne im Bereich der SVZ entlang des Lateralventrikels. In C sind beispielhaft ein striatales TH-immunreaktives Neuron (braun) und drei umgebene BrdU-immunreaktive Zellkerne (schwarz) abgebildet. Eine Kolo kalisation liegt nicht vor. Maßstab = 1 mm (A), 100 µm (B) und 25 µm (C).
 Legende: cc=Corpus callosum, CPu=Caudatus-Putamen-Komplex (Striatum), Cx=Cortex, LV=Lateralventrikel, Tu=Tuberculum olfactorium.

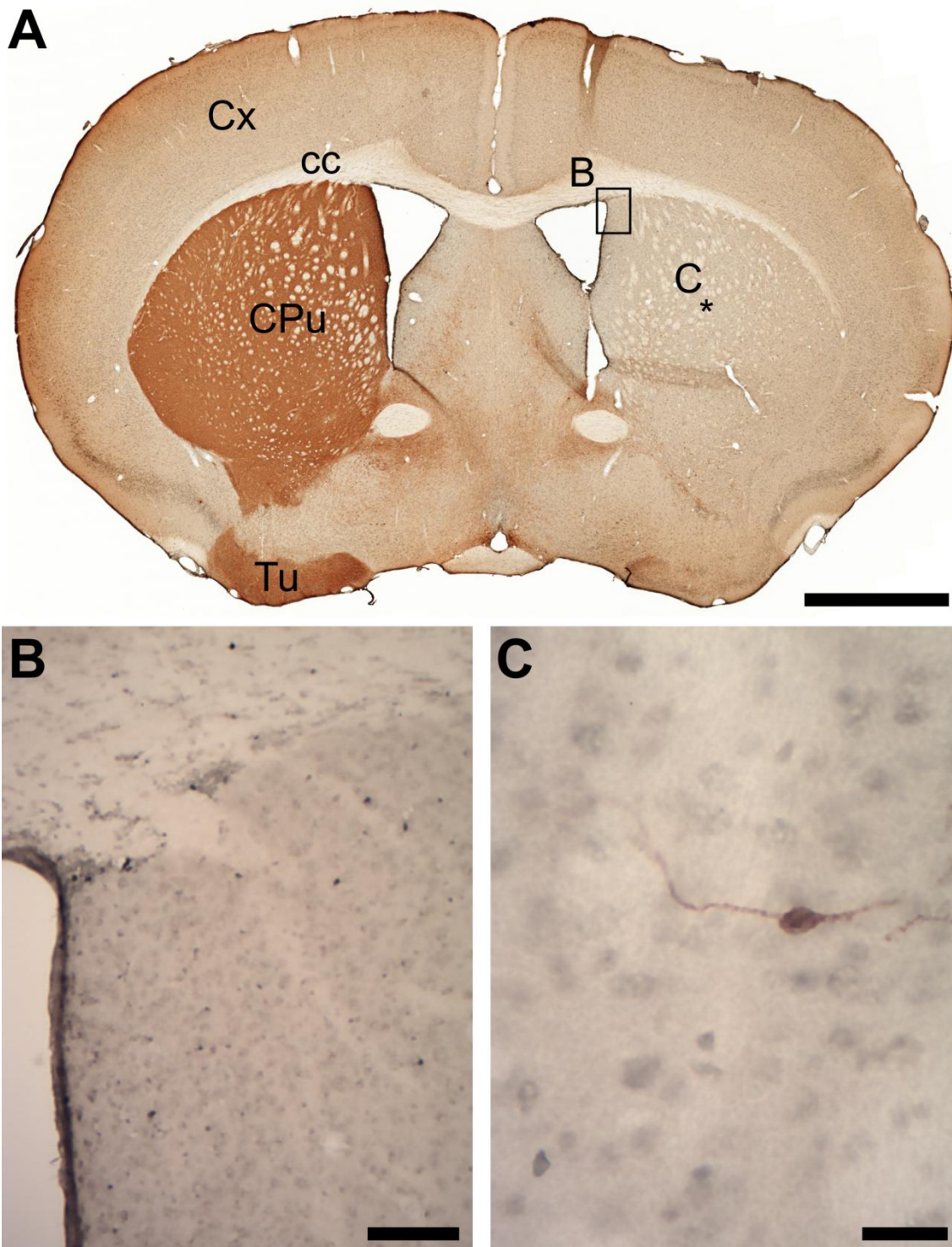


Abb. 7) Immun histochemischer TH- und BrdU-Nachweis am Frontalschnitt durch das Striatum einer unilateral läsierten Maus drei Monate postlesionem.

Abbildung A zeigt die nach drei Monaten nahezu vollständige Degeneration TH-positiver Fasern (braun) in der läsierten rechten Hemisphäre. In B ist eine Ausschnittsvergrößerung des Striatums und der SVZ der läsierten Hemisphäre zu dargestellt. Hierbei ist die deutliche Abnahme BrdU-positiver Zellkerne (schwarz) in Striatum und SVZ drei Monate nach Läsion erkennbar. Abbildung C zeigt, dass auch drei Monate nach Läsion TH-positive Neurone (braun) im Striatum aufzufinden sind. Eine Kolokalisation mit BrdU liegt zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nicht vor. Maßstab = 1 mm (A), 100 µm (B) und 25 µm (C). Legende: cc=Corpus callosum, CPu=Caudatus-Putamen-Komplex, Cx=Cortex, LV=Lateralventrikel, Tu=Tuberculum olfactorium.

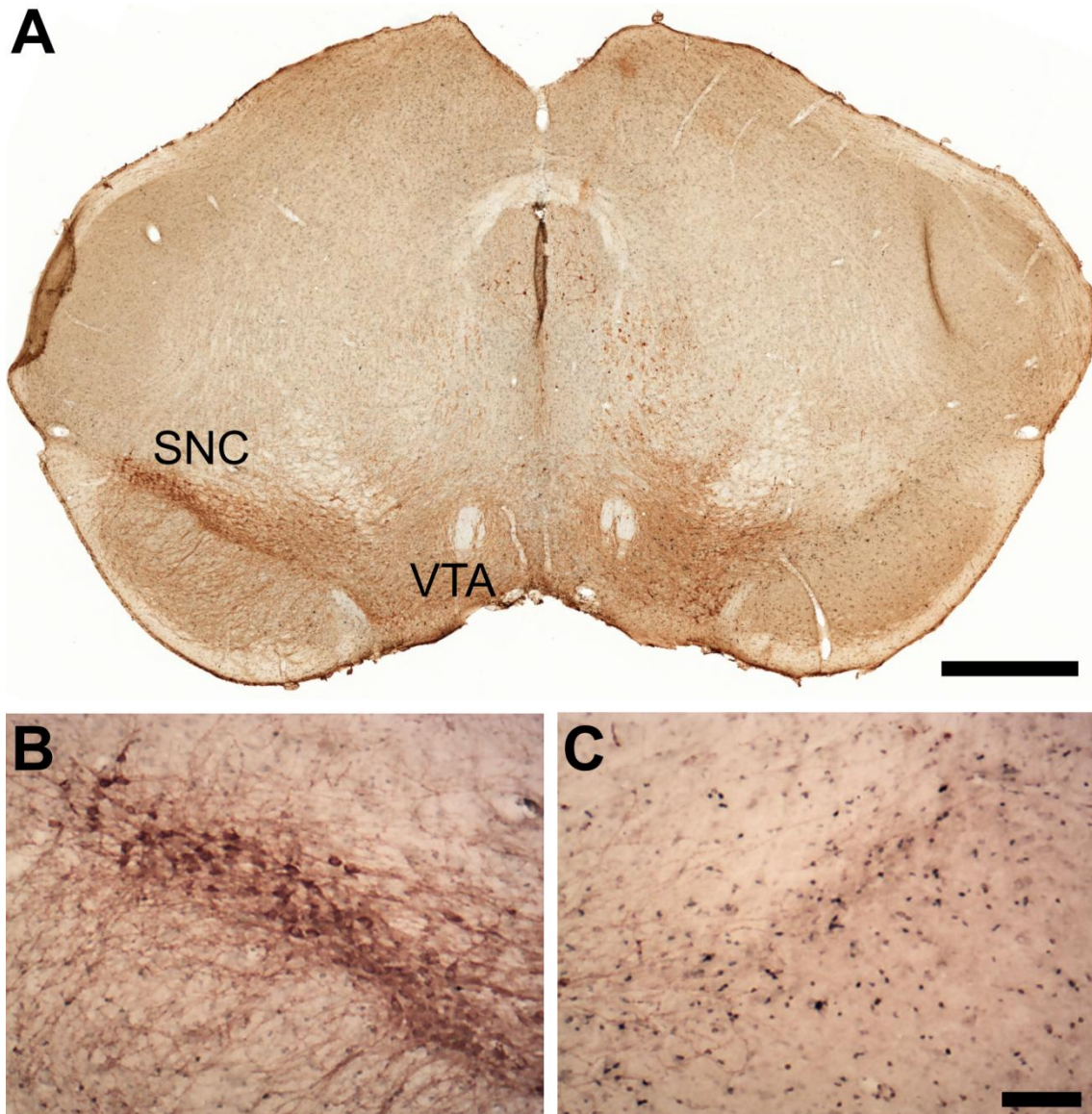


Abb. 8) Immun histochemischer TH- und BrdU-Nachweis an einem Frontalschnitt des Mittelhirns drei Tage postlesionem.

In der Übersicht (A) ist die linke intakte SNC anhand der braunen TH-immunreaktiven Neurone, sowie der kontralaterale Verlust TH-positiver Neurone in der rechten läsierten SNC, erkennbar. In der Abbildung B sind die dopaminergen TH-exprimierenden Neurone (braun) der intakten Hemisphäre in höherer Vergrößerung dargestellt und es finden sich nahezu keine BrdU-immunreaktiven Zellkerne (schwarz) in diesem Bereich. Abbildung C ist ein vergrößerter Ausschnitt aus der läsierten SNC. Neben dem Verlust der TH-immunreaktiven Neurone und Fasern fällt die vermehrte Anzahl BrdU-immunreaktiver Zellkerne (schwarz) auf. Diese Zunahme ist durch läsiensbedingte Gewebeveränderungen zu erklären. Maßstab = 700 μm (A), 100 μm (B, C). Legende: SNC=Substantia nigra pars compacta, VTA=ventrales Tegmentum.

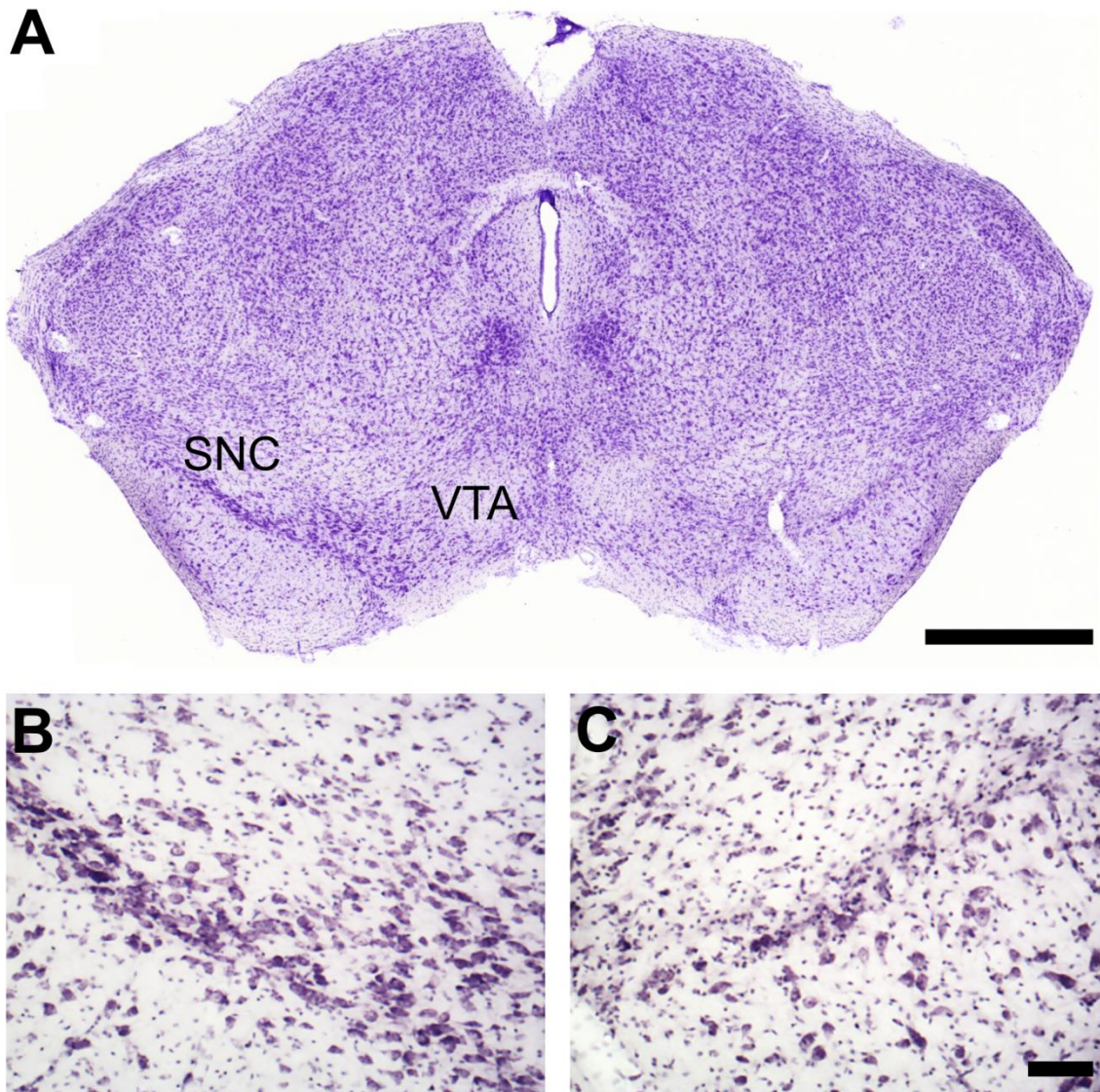


Abb. 9) Darstellung eines Nissl-gefärbten Frontalschnittes durch das Mittelhirn drei Tage postlesionem.

In der Übersicht (A) ist in der intakten linken Hemisphäre das Band der dopaminergen großen Perikarya der SNC zu sehen. Der Zellverlust in der läsierten rechten SNC ist ebenfalls zu erkennen. In den vergrößerten Ausschnitten der intakten (B) und läsierten (C) SNC wird der Seitenunterschied deutlich. Maßstab = 700 μ m (A), 100 μ m (B, C). Legende: SNC=Substantia nigra pars compacta, VTA=ventrales Tegmentum.

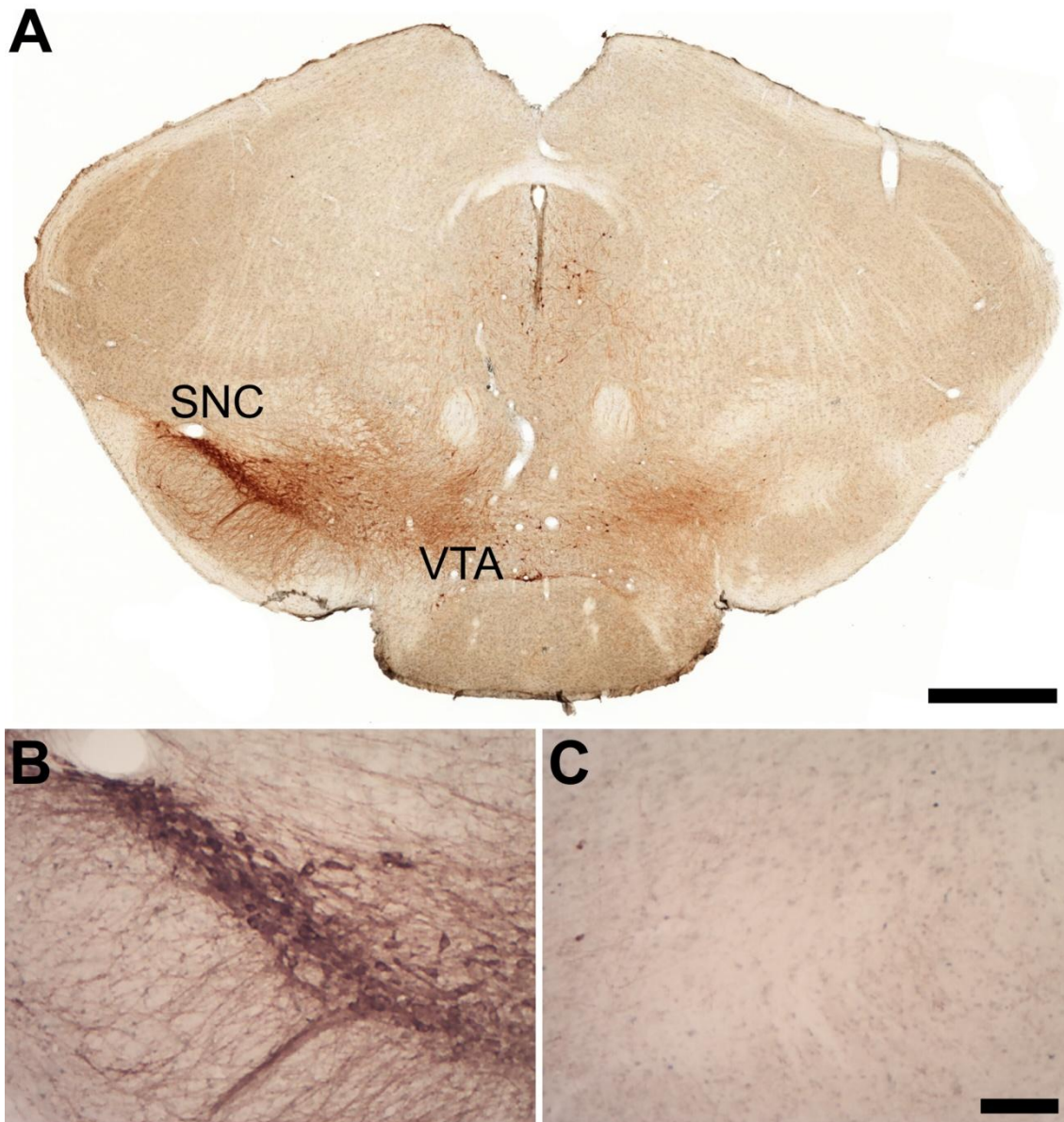


Abb. 10) Darstellung eines immunhistochemisch gegen TH und BrdU gefärbten Frontalschnittes durch das Mittelhirn drei Monate postlesionem.

In der Übersicht (A) ist die linke intakte SNC anhand der braunen TH-immunreaktiven Neurone, sowie der kontralaterale Verlust TH-positiver Neurone in der rechten läsierten SNC, erkennbar. In der Abbildung B sind die dopaminergen TH-exprimierenden Neurone (braun) der intakten Hemisphäre in höherer Vergrößerung dargestellt und es finden sich nahezu keine BrdU-immunreaktiven Zellkerne (schwarz) in diesem Bereich. Abbildung C ist ein vergrößerter Ausschnitt aus der läsierten SNC. Der Verlust der TH-immunreaktiven Neurone und Fasern ist immer noch vorhanden, jedoch hat die Anzahl BrdU-immunreaktiver Zellkerne (schwarz) gegenüber dem Zeitpunkt 3 Tage wieder abgenommen. Maßstab = 600 µm (A), 100 µm (B, C). Legende: SNC= Substantia nigra pars compacta, VTA=ventrales Tegmentum.

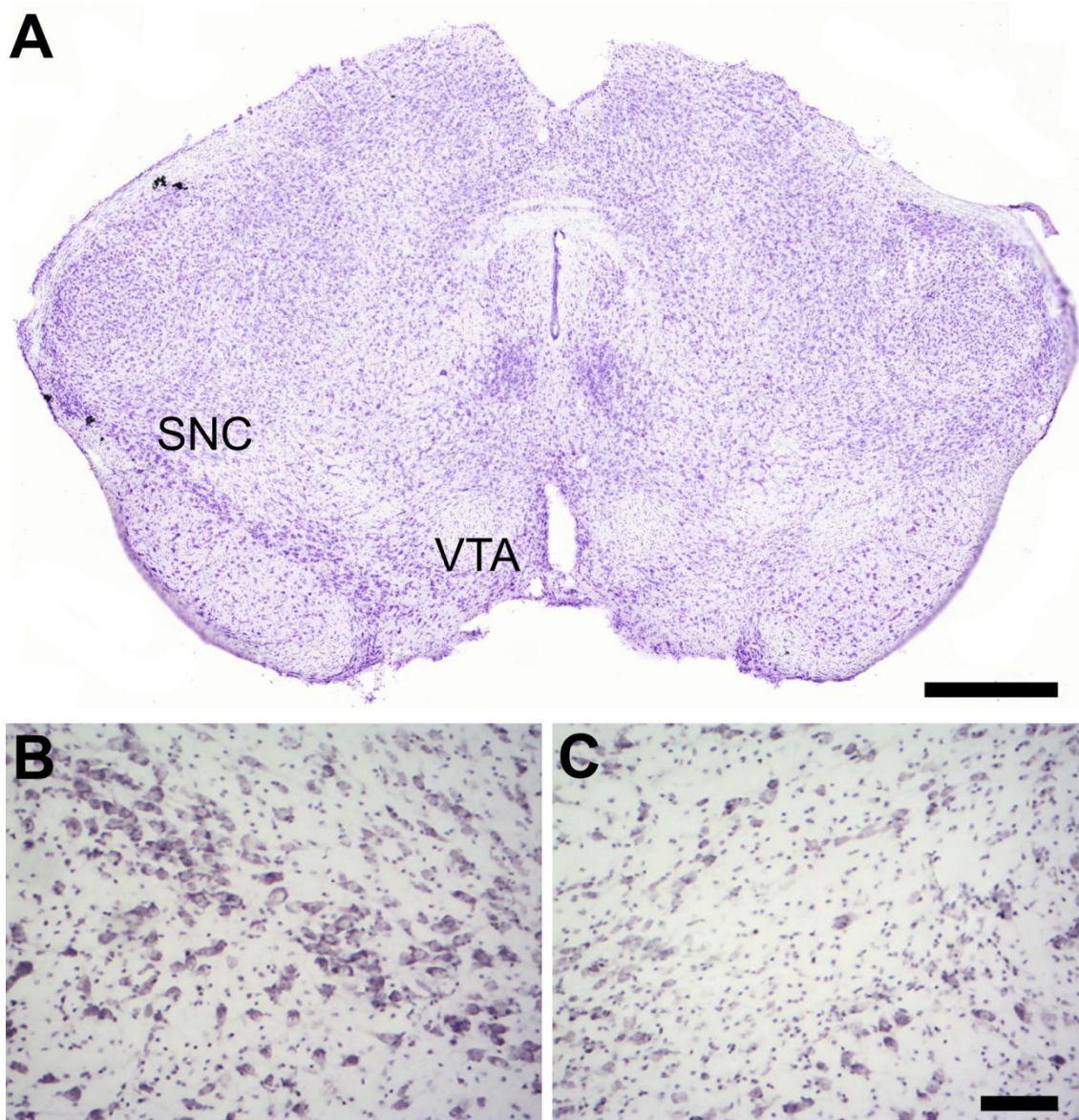


Abb.11) Darstellung eines Nissl-gefärbten Frontalschnittes in der Region des Mittelhirns drei Monate postlesionem.

In der Übersicht A ist der unilaterale Verlust dopaminerger Neurone der SNC in der rechten läsierten Hemisphäre zu erkennen. In den vergrößerten Ausschnitten der intakten (B) und läsierten (C) SNC wird der Seitenunterschied deutlich. Maßstab = 650 μ m (A), 100 μ m (B, C).
Legende: SNC=Substantia nigra pars compacta, VTA=ventrales Tegmentum.

Ergebnisse

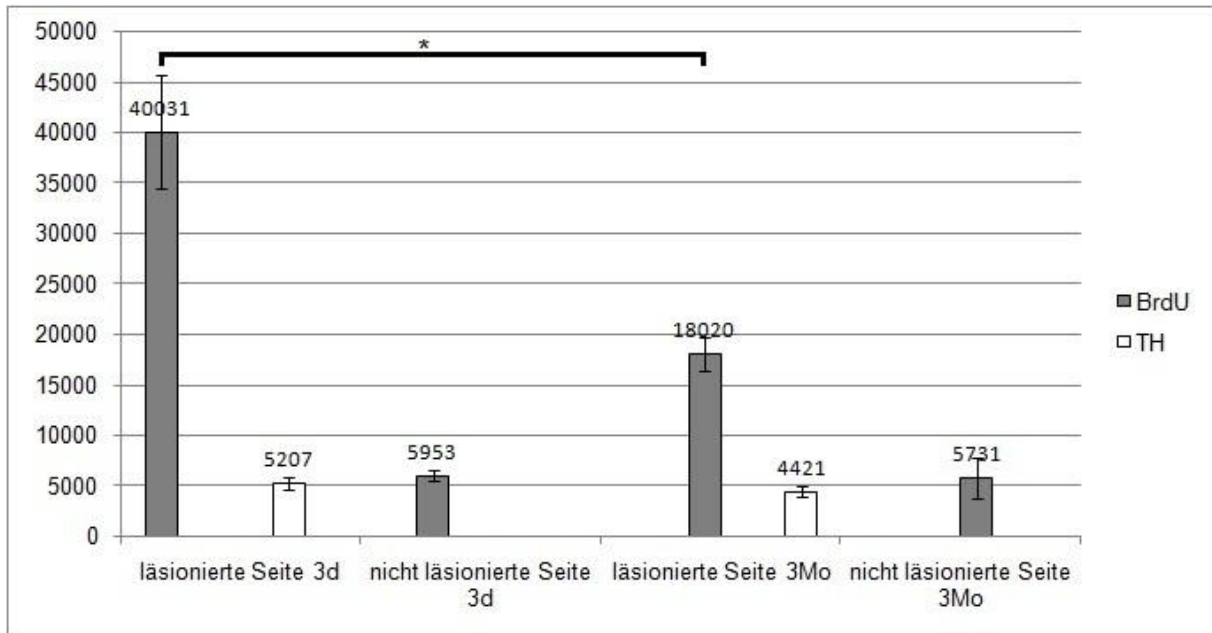


Abb.12) Ergebnisse der Ermittlung von BrdU- und TH-positiven Zellen im Striatum unilateral 6-OHDA-läsionierter Mäuse.

Dargestellt sind die BrdU- bzw. TH-positiven Zellzahlen im Striatum der läsionierten Hemisphäre einer Maus nach drei Tagen und drei Monaten. Ebenfalls aufgetragen ist die Anzahl BrdU-positiver Zellen im Striatum der nicht-läsionierten Hemisphäre nach drei Tagen und drei Monaten. TH-positive Zellen konnten in der intakten Hemisphäre nicht nachgewiesen werden. Es ergibt sich eine statistische Signifikanz von $* = 0,004$ im U-Test.

4 Diskussion

Diesen Untersuchungen liegt die Fragestellung zu Grunde, ob die Tyrosinhydroxylase-(TH)-positiven Neurone (TH ist das Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese), welche nach unilateraler 6-Hydroxydopamin-(OHDA)-Läsion im deafferentierten Striatum nachweisbar sind, das Resultat adulter Neurogenese darstellen und inwiefern deren Quantität eine motorisch-funktionelle Besserung postlesionem hervorrufen (Darmopil et al., 2008).

Zu diesem Zweck wurde adulten, männlichen C57BL/6-Mäusen sieben Tage, beginnend drei Tage vor einer unilateralen 6-OHDA-Injektion, Bromdesoxyuridin (BrdU) intraperitoneal verabreicht. Drei Tage nach der 6-OHDA-Läsion wurden einem Teil der Versuchstiere die Hirne entnommen und immunhistochemisch, mit Färbungen gegen inkorporiertes BrdU und TH in einem Doppelmarkierungsverfahren, aufgearbeitet. Die motorischen Leistungen der verbleibenden Tiere wurden monatlich (alle 30 Tage) mittels des Zylindertests sowie des Apomorphin-induzierten Rotationstests, erfasst. Nach einem Zeitraum von drei Monaten wurden auch die Hirne der zweiten Gruppe entnommen und nach obigem Schema immunhistochemisch behandelt. In den Hirschnitten beider Gruppen wurde die Anzahl der TH- und/oder BrdU-positiven Neurone im Striatum der läsierten Hemisphäre sowie die Zahl der BrdU-positiven Zellen im Striatum der entsprechend kontralateralen Seite nach statistischen Verfahren ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass TH-positive Neurone im Striatum der läsierten Hemisphäre bereits drei Tage nach der Läsion nachweisbar sind, aber kein Ergebnis adulter Neurogenese darstellen und sich dieses Phänomen eher als phänotypischen Wechsel („Shift“) beschreiben lässt. Es konnte ermittelt werden, dass die Anzahl der BrdU-positiven Zellen im Striatum der läsierten Hemisphäre, im Vergleich zur nicht läsierten Seite, signifikant erhöht war. Weiterhin geht aus dieser Arbeit hervor, dass weder die Anzahl der BrdU-positiven, noch die der TH-positiven, Zellen im deafferentierten Striatum nach der Läsion zu einer motorisch-funktionellen Verbesserung führen.

4.1 Auswertung der motorischen Tests

Der deutlich bevorzugte Gebrauch der rechten Vorderpfote im Zylindertest zeigt, dass die Tiere der zweiten Versuchsgruppe einen massiven Verlust an

Diskussion

dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra (SN), hervorgerufen durch die 6-OHDA-Läsion, aufweisen (Iancu et al., 2005; Lindvall et al., 2005). Dies wird durch die Ergebnisse des Apomorphin-Rotationstests bestätigt, in welchem anfänglich im Mittel 7,7 Nettorotationen je Minute zu registrieren waren. Wie Iancu und Mitarbeiter (2005) herausstellen, fällt der Apomorphin-Rotationstest nur dann deutlich positiv aus, wenn der Zellverlust in der SN bei mehr als 90% liegt, was mit mehr als 18 Nettorotationen in der Minute hier zutrifft. Die Tiere der ersten Versuchsgruppe waren, aufgrund ihrer Einschränkungen durch den läsionierenden Eingriff, im vorgesehenen Zeitraum von drei Tagen nach der Läsion nicht fähig motorische Tests zu absolvieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass, entgegen den Studien von Iancu und Mitarbeitern (2005), sowohl der Zylindertest, als auch der Apomorphin-Rotationstest sich durchaus eignen, um eine Läsion bei unilateral dopaminerg deafferentierten Mäusen zu detektieren. Besonders letzterer zeigt nach Untersuchungen von Grealish und Mitarbeitern (2010) eine hohe Korrelation zum 6-OHDA-induziertem nigralen Zellverlust. Zu beachten sind hierbei sowohl Läsionsmethode, Zeitabstand zwischen Läsion und Testzeitpunkt, Nettorotationszahl je Minute, welche als Läsionserfolg gewertet wird, der erreichte Zellverlust sowie die gewählte Dosis der Rotationen auslösenden Substanz.

Die motorischen Defizite nach der Läsion erweisen sich in beiden hier durchgeführten Tests als konstant. Im Zylindertest konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg eine Nutzung der Vorderpfoten im Verhältnis von annähernd 2:1 beobachtet werden. Der Apomorphin-Rotationstest zeigte nach einem, im Vergleich zum Modell der Ratte, als Läsionserfolg zu wertenden Wert anschließend sogar einen Anstieg auf nahezu den dreifachen Ausgangswert. Die erhobenen Daten legen nahe, dass zwei Monate nach der Läsion im Apomorphin-Rotationstest eine Plateauphase erreicht wird (Abb. 5).

Das oben aufgeführte Verhalten der Tiere in den motorischen Tests ist bedingt durch die dopaminerge Deafferentierung der läsionierten Hemisphäre und der auch bei Nagetieren bestehenden Kreuzung des Tractus corticospinalis zur Innervation der kontralateralen Körperseite (Nieuwenhuys et al., 1998; Donkelaar et al., 2004). Der bevorzugte Gebrauch der rechten Vorderpfote im Zylindertest weist auf einen relativen Dopaminüberschuss der nicht-läsionierten, linken Basalganglienschleife im Vergleich zur läsionierten rechten Hemisphäre hin, was auf den Dopaminverlust durch die Läsion zurückzuführen ist. So benutzt ein Tier zur Erkundung seiner

Diskussion

Umgebung, hier den Glaszylinder, vornehmlich die rechte Vorderpfote, die Teile des Bewegungsprogramms von der nicht-läsionierten, linken, Basalganglienschleife erhält. Bei Gabe von Apomorphin im Rotationstest führt dies zu einer starken Stimulation von Dopaminrezeptoren in den Basalganglienschleifen beider Hemisphären. Jedoch kommt es nach der 6-OHDA-Läsion auf der läsionierten, rechten, Seite aufgrund des Neurotransmittermangels zu einer Hochregulation von Dopaminrezeptoren (Pellegrino et al., 2007). Die Basalganglien der läsionierten Seite (rechts) werden relativ zur nicht-läsionierten Seite (links) überstimuliert, was zu einer verstärkten Bewegung der linken Körperseite führt und letztlich in einer messbaren Rotation resultiert.

Neben den hier durchgeführten motorischen Tests werden von anderen Arbeitsgruppen weitere zur Evaluation durchgeführter Läsionen sowie Symptombesserung zum Beispiel nach Transplantationen oder tiefer Hirnstimulation genutzt (Iancu et al., 2005; Thompson et al., 2009; Grealish et al., 2010).

Der bei unseren Untersuchungen durchgeführte Apomorphin-Rotationstest kann in ähnlicher Weise mit dem indirekten Sympathomimetikum Amphetamin, oder auch Metamphetamin, durchgeführt werden. Die noradrenerge Wirkung des Amphetamins und seiner Derivate führt unter anderem zu einer Ausschüttung von Noradrenalin und Dopamin im ZNS, welche im Striatum unilateral (rechts) läsionierter Tiere nur auf der kontralateralen, nicht-läsionierten Seite (links) zum Tragen kommt. Die massive Neurotransmitterausschüttung bewirkt eine Überstimulation des gesunden (linken) Striatums und damit eine Rotation in die Richtung der läsionierten Hemisphäre (rechts) (Haas, 2009). Die Applikation des Amphetamins erfolgt in aller Regel intraperitoneal mit einer Dosis zwischen 2,5-5 mg/kg KG (Iancu et al., 2005; Grealish et al., 2010). Die Aussagekraft dieses Tests hinsichtlich des Zellverlustes in der SN wird von verschiedenen Arbeitsgruppen recht unterschiedlich beurteilt (Iancu et al., 2005; Thompson et al., 2009; Grealish et al., 2010), erscheint aber derzeit am Parkinson-Mausmodell noch als recht unsicher (nicht veröffentlichte Versuchsergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe). Die Wertigkeit des Amphetamin-Rotationstests scheint stark von der genutzten Dosis und dem Intervall der Testläufe abzuhängen (Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe).

Schon 1968 untersuchten Jones und Mitarbeiter die Nutzung eines Rotarod-Systems zur Beurteilung der Motorik von Mäusen. Hierbei wird die Dauer ermittelt, welche

Diskussion

trainierte Mäuse, oder auch Ratten, auf einer sich mit etwa 15 Umdrehungen je Minute rotierenden Walze bei geringer Fallhöhe zubringen können. So konnte gezeigt werden, dass der dopaminerge Zellverlust mit der Leistung im Rotarod-System invers korreliert, wobei eine geringe Zeit auf einen großen Zellverlust hindeutet (Iancu et al., 2005). Letztlich liegt der positive prädiktive Wert dieses Versuches aber hinter dem pharmakologisch induzierter Rotationen zurück (Iancu et al., 2005).

Eine Experimentieranordnung, welche besonders Defizite in der sensomotorische Integration unilateral 6-OHDA-läsionierter Mäuse aufdecken soll, wurde von Dowd und Mitarbeitern (2005) von klassischen Tests adaptiert (Marshall et al., 1974) und vorgestellt. Es wurden zwei parallele Korridore genutzt, die nach oben durch eine Plexiglasscheibe einsehbar waren. Während ein Gang leer war und nur zur Gewöhnung an die Umgebung genutzt wurde, enthielt der andere zehn Paare paralleler Näpfe mit Zuckerpellets. Untersucht wurde, nach einer kurzen Eingewöhnung, die Seitenpräferenz beim Auffinden des Zuckers, da anzunehmen ist, dass die von der nicht-läsionierten (linken) Hemisphäre gesteuerte Körperhälfte (rechts) vermehrt zur Erkundung der Umgebung genutzt wird. Dieser Test zeigte den höchsten positiven prädiktiven Wert zur Ermittlung des dopaminergen Zelluntergangs (Grealish et al., 2010). Die bisherigen Erfahrungen mit dem Korridor-Test sind eher als gering einzuschätzen, besonders bei der Erforschung des Morbus Parkinson am Mausmodell, sodass zur Bestätigung der von Grealish und Mitarbeitern (2010) dargelegten Ergebnisse weitere Studien anderer Forschungsgruppen notwendig sind.

Im Kontext mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Brundin et al., 1986; Iancu et al., 2005; Grealish et al., 2010) zeigen verschiedene Studien teils unterschiedliche Ergebnisse zur Aussagekraft motorischer Tests hinsichtlich des Zellverlustes in der SN. Eine mögliche Ursache scheint in der Dosierung der Pharmaka zu liegen, abhängig davon, ob sich die Arbeitsgruppe am Modell der Ratte orientierte oder sich interner Optima bediente. Die Frage nach einer klar definierten Grenze, ab wann entsprechendes Verhalten bei Mäusen für eine erfolgreiche Läsion spricht, konnte keine der Studien von Iancu et al. (2005) und Grealish et al. (2010), welche sich mit motorischer Leistung bei induziertem, intranigralem Zellverlust bei Mäusen beschäftigte, beantworten.

4.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

4.2.1 Beurteilung der Primärantikörper

Anti-BrdU-Antikörper binden an freies, proteingebundenes und auch an inkorporiertes BrdU, wenn letzteres in Form von Einzelsträngen vorliegt (AbD Serotec Produktinformationen). Dieser Antikörper weist nahezu keine bekannten Kreuzreaktionen auf, mit Ausnahme einer schwach-positiven Markierung von Chlorodesoxyuridin. Unter Beachtung der Morphologie von Nuclei neuronaler Zellen, kann die falsch-positive Bewertung von freiem oder proteingebundenem BrdU als minimal bis unwahrscheinlich erachtet werden, sodass in erster Linie falsch-positive Reaktionen mit Chlorodesoxyuridin in Betracht kommen. Ebenfalls von Relevanz, bei der Betrachtung möglicher Fehler im Umgang mit diesem Primärantikörper, ist der Vorgang der DNS-Denaturierung, da nur einsträngige, denaturierte DNS markiert werden kann. Bei ungenügender oder fehlender Denaturierung würde die Färbung sehr unspezifisch sein (Vanderlaan und Thomas, 1985; Dolbeare, 1995).

Anti-TH-Antikörper markieren das N-terminale Ende des Enzyms in den Zellen aller Säuger und auch einiger anderer Spezies (Chemicon/Millipore Produktinformationen). TH ist nicht nur das Schrittmacherezym der Dopaminsynthese, sondern katalysiert generell chemische Reaktionen im Rahmen der Katecholaminsynthese, sodass auch adrenerge und noradrenerge Zellen mit diesem Antikörper spezifisch markiert werden (Betarbet et al., 1997). In Anbetracht der klaren motorischen Defizite der Versuchstiere, die auf eine unilaterale Schädigung der Basalganglienschleife zurückzuführen ist, und der unter 3.3 und in der Abbildung 6 sowie im Folgenden dargestellten intraindividuellen Positivkontrolle bekannter dopaminerger Kerngebiete, wird die Markierung als immunhistochemische Darstellung dopaminerger/katecholaminerger Neurone gewertet.

4.2.2 BrdU/TH-Doppelmarkierung

Die Doppelmarkierung und damit beide Färbungen, sowohl gegen inkorporiertes BrdU, als auch gegen TH, können als positiv betrachtet werden. Nach Kempermann (2006) befindet sich periventriculär, dicht neben dem Striatum, eine Zone adulter Neurogenese, welche hier deutlich nachgewiesen werden konnte (Abb. 6 und 7) und somit eine erfolgreiche Durchführung der BrdU-Markierung belegt. Die SN und das

Diskussion

Striatum der läsierten Seite weisen eine stark geminderte Konzentration von TH auf. Im Gegensatz zur SN und dem Striatum der nicht-läsierten linken Seite, welche eine starke braune Färbung als Zeichen ihrer großen TH-Konzentration zeigt, sind beide Gebiete der rechten Hemisphäre relativ blass (Abb. 6 und 7), was für eine gelungene Läsion und ordnungsgemäße immunhistochemische Färbung spricht (Lundblad et al., 2004; Iancu et al., 2005; Grealish et al., 2010).

Außer der periventrikulären Lokalisation von BrdU, sind entsprechend markierte Zellen auch im Striatum der läsierten und nicht-läsierten Hemisphäre zu beobachten. Die BrdU-inkorporierenden Zellen in der linken, „gesunden Kontrollhemisphäre“ zeigen sich, wie in 3.3 beschrieben und in Abb. 6 A und 7 A dargestellt, in ihrer Anzahl über den Beobachtungszeitraum konstant. Aufgrund fehlender Doppelmarkierungen mit BrdU und TH, muss davon ausgegangen werden, dass es sich am wahrscheinlichsten um Gliazellen handelt. Bei den BrdU-positiven Zellen der läsierten Hemisphäre gab es ebenfalls keine Kolo-kalisation mit TH. Im Vergleich zur nicht-läsierten Hemisphäre zeigte sich eine signifikant höhere Zahl BrdU-positiver Zellen, welche, ebenfalls signifikant, im Beobachtungszeitraum abnahm. Es ist auch für diese Zellen zu vermuten, dass es sich nicht um dopaminerge Neurone handelt, denn diese müssten TH als Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese besitzen. Am wahrscheinlichsten erscheint die Migration von Mikrogliazellen nach der Läsion in das geschädigte Gewebe, da diese, sowohl in ihrer Aufgabe als Gliazellen, als auch als Bestandteil des mononukleär-phagozytären Immunsystems, Neurone schützen, in ihrer Regeneration unterstützen und untergegangenes Gewebe phagozytieren müssen (Ransohoff und Cardona, 2010). Aber auch eine verstärkte Proliferation von anderen Gliazellen oder Interneuronen beispielsweise zur Defektdeckung scheint denkbar, da bei vielen der quantifizierten Zellen die Morphologie sowohl des Kerns, als auch des Somas, nicht die typischen Kriterien aktivierter oder aber ruhender Mikroglia zeigten.

Bereits drei Tage nach der Läsion konnten im Striatum der läsierten Hemisphäre TH-positive Zellen nachgewiesen werden. Dies gelang auch in der zweiten Versuchsgruppe (90 Tage postlesionem) noch, jedoch zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang (siehe 3.3 und Abb. 6 B/C und 7 B/C sowie 12). Des Weiteren konnte im Rahmen der Quantifizierung keine BrdU/TH-doppelt markierte Zelle nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich nicht um Neurone aus einem Prozess adulter Neurogenese handelt, sondern legt viel mehr

Diskussion

einen phänotypischen Wechsel von Zellen, induziert durch die dopaminerge Deafferentierung, nahe. Ein phänotypischer Wechsel, wie er hier herausgestellt wurde, ist im ZNS sonst selten beschrieben und wird eher bei Aspekten der neuronalen Plastizität, des Lernens oder in Verbindung mit chronischem Schmerz beobachtet. Ursächlich für die Veränderung der Zellen nach der Läsion könnten die vielen verschiedenen Mediatoren und neurotrophen Faktoren sein, die bei Mikrogliazellen nachgewiesen werden konnten (Kraft und Harry, 2011; Marin-Teva et al., 2012). Es scheint denkbar, dass durch die Läsion Mikrogliazellen zur Phagozytose der untergegangenen Zellen und Defektdeckung migrieren. Während oder durch die Arbeit der Mikrogliazellen werden Mediatoren zur Induktion der Reorganisation des geschädigten Areals freigesetzt. Dies könnte ein Hinweis auf eine weitere, von Kempermann (2006) vermutete, Funktion der Mikrogliazellen als „physiologischen Sensor für den Bedarf der Plastizität“ sein. Die Ergebnisse von Lopez-Real et al. (2003) lassen dies ebenfalls möglich erscheinen. So konnte herausgestellt werden, dass TH-positive Zellen nicht im total deafferentierten Striatum zu beobachten sind, sondern sich die Lokalisation eben dieser Neurone insbesondere auf fortgeschrittene, chronische und Teilläsionen fokussiert. Auch zeigten weder eine nach der Dopamindeafferentierung durchgeführte L-DOPA-Therapie, noch eine serotoninerge Deafferentierung Auswirkungen auf die Zahl oder die Lokalisation der TH-positiven Zellen. Das Signal zum phänotypischen Wechsel ist somit nicht primär im absoluten Dopaminmangel der entsprechenden Hirnregion zu sehen, da eher eine starke Verminderung bei geringer verbleibender Restaktivität die Entstehung solcher TH-immunreaktiven Neurone fördert. Dies scheint in Hinsicht auf eine mögliche Defektdeckung und Reorganisation gerade in Arealen mit Restfunktion schlüssig.

Die hier beobachteten TH-immunreaktiven Zellen (vgl. Abb. 6 C und 7 C) können als pseudounipolare bis bipolare Neurone mit rundlich bis ovalem Soma und einem Durchmesser von etwa 10-12 μm beschrieben werden. Terminal zeigte sich bei einigen dieser Zellen eine feine Arborisierung mit dendritischen Dornen (hier nur angedeutet in Abb. 6 C erkennbar). Dies deckt sich mit Beschreibungen und Klassifizierungen anderer Arbeitsgruppen wie unter 1.6 ausgeführt (Lopez-Real et al., 2003; Ibáñez-Sandoval et al., 2010; Masuda et al., 2011). Die Morphe ist eher untypisch für aktivierte Mikrogliazellen, da sie durch ein längliches Soma, viele

Diskussion

Dendriten und eine ausgeprägte Arborisierung sowie dendritische Dornung charakterisiert sind.

Darmopil und Mitarbeiter (2008) wiesen Calbindin, Dynorphin, Enkephalin und, bei etwa der Hälfte der TH-positiven Zellen, auch DOPA-Decarboxylase nach, konnten jedoch keine Dopamintransporter an diesen Zellen finden und vermuteten, dass es sich um Projektionsneurone des direkten und indirekten Weges der Basalganglienschleife handelt (Abb. 1). Die DOPA-Decarboxylase ist ein Enzym, das viele Reaktionen katalysiert, so zum Beispiel die Decarboxylierung von L-DOPA zu Dopamin, was die positiven Erwartungen im Rahmen der Forschung am IPS, welche die Arbeitsgruppe um Darmopil in diese Zellen setzen, begründet. Andere Arbeitsgruppen (Ibáñez-Sandoval et al., 2010; Tepper et al., 2010; Masuda et al., 2011) charakterisierten diese Neurone weiter als GABA-erge Interneurone, die in Kontakt mit striatalen Projektionsneuronen zu sehen sind. Da die beobachteten TH-positiven Neurone keine nachweisbaren Veränderungen auf eine Dopaminersatztherapie in Form von L-DOPA zeigten (Lopez-Real et al., 2003) und ihre Zahl im hier gewählten Beobachtungszeitraum konstant blieb, stellt sich die Frage wieso Projektionsneurone, die beim Gesunden stark durch dopaminerge Afferenzen moduliert werden nicht reagieren.

Der statistisch ermittelte Fehlerkoeffizient (siehe Statistik im Anhang) der Erfassung der Zellzahlen, legt auch hinsichtlich weiterer Untersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe nahe, dass die Erhöhung der Schnitzzahl durch Wahl einer 3er-Serie statt einer 6er-Serie zur Verbesserung der Ergebnisse führt.

4.3 Beantwortung der Fragestellung und Ausblick

Zusammenfassend kann man die in 1.6 gestellten Fragen, welche sich diese Arbeit stellte, wie folgt beantworten:

1. Da keine BrdU/TH doppelt markierten Zellen nachgewiesen werden konnten, handelt es sich bei den, nach unilateraler 6-OHDA-Läsion im zur Läsion ipsilateralen Striatum der Maus, auftretenden TH-positiven Zellen nicht um Zellen adulter Neurogenese. Viel mehr liegt ein phänotypischer Wechsel schon bestehender Neurone nahe.

Diskussion

2. Bereits drei Tage nach der Läsion lassen sich TH-positive Neurone nachweisen.
3. Drei Tage postlesionem konnten 40031 ± 5640 BrdU-positive und 5207 ± 662 TH-positive Zellen im Striatum der läsierten Hemisphäre aus Stichproben statistisch errechnet werden. Die Anzahl der BrdU-positiven fällt im Zeitraum von 90 Tagen signifikant auf 18020 ± 1736 , wobei die TH-positiven Zellen mit einem Wert von 4421 ± 517 nach dem gleichen Zeitraum, nicht signifikant quantifiziert werden konnten.
4. Es wurde in der untersuchten Stichprobe keine Besserung einer Symptomatik durch die durchgeführten motorischen Tests beobachtet. Ein Zusammenhang könnte in der Abnahme der BrdU-positiven Zellen über den Zeitraum von 90 Tagen und der im Apomorphin-Rotationstest progredient schlechteren motorischen Leistung zu sehen sein.

Trotz des Nachweises von Enkephalin, Calbindin, Dynorphin, DOPA-Decarboxylase, TH und der Schlussfolgerung, dass es sich bei den im ipsilateralen Striatum postlesionem nachweisbaren Zellen um Projektionsneurone der Basalganglien handelt (Darmopil et al, 2008), konnte keine messbare motorisch-funktionelle Besserung registriert werden. Um die Sensitivität weiterer Untersuchungen zu erhöhen, scheint es möglich nicht nur die motorischen Symptome der Erkrankung als Indikator zu nutzen, sondern zusätzlich auch die Begleitsymptome (vergleiche 1.2 Symptome) zu quantifizieren und im Verlauf zu beobachten (Taylor et al., 2010). Untersuchungsmethoden zur Begleitsymptomatik sind nach Taylor et al. (2010) beschrieben und sollten zunehmend Verbreitung finden. Als am zugänglichsten erscheinen die Hyposmie, Schlafstörungen, gastrointestinale Dysregulationen und Ängstlichkeit.

Die hier vorliegende Arbeit konnte somit herausstellen, dass bei einer direkten Übertragung des 6-OHDA-Modells von der Ratte auf die Maus, trotz starker Artverwandtschaft, kaum bekannte neurobiologische und biochemische Reaktionen auftreten. Dies wurde in Form der TH-immunreaktiven Zellen beobachtet, welche drei Tage nach der Läsion im Striatum der entsprechenden Seite nachzuweisen waren und deren Anzahl über den Beobachtungszeitraum von 90 Tagen hinweg konstant blieb. Weiterhin zeigten die immunhistochemischen Untersuchungen, dass diese

Diskussion

Zellen durch einen phänotypischen Wechsel entstanden sind. Obwohl die hier beobachteten Zellen Tyrosinhydroxylase, ein Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese, enthalten, scheinen sie doch nicht fähig zu sein, diesen Neurotransmitter im ZNS zu synthetisieren, da sich weder deren Anwesenheit, noch ihre Anzahl auf die motorischen Tests zur Beurteilung der Symptomatik bei PD niederschlugen.

Der aus unseren Untersuchungen gezogene Schluss, dass es sich bei den untersuchten Zellen um einen phänotypischen Wechsel handelt, legt Fragen nach der Herkunft, Zukunft und weiteren Funktion dieser Zellen nahe. Auch die nötige biochemische Umgebung, welche zu eben diesem Wechsel führte ist für weitere Untersuchungen zur Differenzierung von Interesse, da bekannt ist, dass unter anderem der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) zu einer signifikanten Erhöhung der TH-immunreaktiven Zellzahl führen kann (Du et al., 1995). Es würde nicht nur das Verständnis von den Abläufen von Differenzierung und phänotypischem Wechsel im adulten Hirn festigen, sondern auch die Unterschiede zum Modell der Ratte herausstellen. Die Schaffung einer geeigneten Umgebung zum Wechsel des Phänotyps kann auch für Zelltransplantationsexperimente unter anderem bei Morbus Parkinson von Interesse sein. In diesem Kontext sind auch die Ergebnisse von Masuda et al. (2011) zu betrachten. Der Nachweis von mRNA, die die Information für die Expression von TH enthält und die vermutliche Entwicklung eines Teils der TH-positiven Neurone aus Vorläuferzellen, welche auch striatale Projektionsneurone generiert, lässt diese Gruppe von Neuronen als mögliches Ziel für weitere Untersuchungen erscheinen. Eine biochemische Beeinflussbarkeit hinsichtlich der Expression von TH wäre zu prüfen und anschließend deren funktionelle Auswirkungen auf das motorische System beispielsweise durch die hier angewandten motorischen Tests zu evaluieren. Obwohl sich die bisherige Forschung auf der komplexen in-vivo Umgebung des ZNS bewegte, scheint es zur genaueren Analyse der biochemischen Beeinflussbarkeit und notwendigen Umgebung zum phänotypischen Wechsel nötig die TH-positiven Zellen in-vitro zu kultivieren.

Am wahrscheinlichsten scheint der Ursprung der untersuchten BrdU-positiven Zellen im Pool der Gliazellen zu liegen, was aber von der eigenen Arbeitsgruppe noch eingehender untersucht wird. Ein Teil der BrdU-positiven Zellen ist den

Diskussion

Endothelzellen der hirnversorgenden Gefäße zuzurechnen, diese konnten mikroskopisch gut beurteilt werden.

Der Nachweis TH-positiver Zellen im ipsilateral läsierten Striatum konnte bisher bei Ratten, Primaten und Mäusen beobachtet werden, wohingegen die Ratte das in der Literatur am häufigsten verwendete Modelltier bei Untersuchungen zur Parkinsonerkrankung ist. Obwohl nach Ordnung und Familie eng verwandt (Nowak, 1999), scheint es gerade im Rahmen neurobiologischer Untersuchungen geboten das Studium am Modell der Maus zu vertiefen, um so das Verständnis untersuchter Vorgänge zu erhöhen. Dies würde zu einer Verbesserung der Planung und Interpretation von Experimenten führen. Es stellt letztlich auch eine unverzichtbare Grundlage dar um die Arbeit mit transgenen und knock-out Mäusen solide in die weitere Erforschung des Morbus Parkinson einzubinden.

5 Literaturverzeichnis

Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A, Kragh-Sørensen P (2003) Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. *Arch Neurol* 60: 387-392

Andreeva N, Ungethüm U, Heldt J, Marschhausen G, Altmann Th, Andersson K, Gross J (1996) Elevated potassium enhances glutamate vulnerability of dopaminergic neurons developing in mesencephalic cell cultures. *Exp Neurol* 137: 255-262

Baik J-H, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E (1995) Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377: 424–428

Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2: 325-334

Benabid AL, Pollak P, Gervason C (1991) Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet* 337: 403–406

Bennett MC, Bishop JF, Leng Y, Chock PB, Chase TN, Mouradian MM (1999) Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *J Biol Chem* 274: 33855–33858

Betarbet R, Turner R, Chockkan V, DeLong MR, Allers KA, Walters J, Levey AI, Greenamyre JT (1997) Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J Neurosci* 17: 6761-6768

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzi G, Garcia-Osuna M, Panov AL, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3: 1301-1306

Literaturverzeichnis

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

Björklund A Lindvall O (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 3: 537-544

Breese GR, Traylor TD (1970) Effect of 6-hydroxydopamine on brain norepinephrine and dopamine: evidence for selective degeneration of catecholamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 174: 413–420

Brundin P, Isacson O, Gage FH, Prochiantz A, Björklund A (1986) The rotating 6-hydroxydopamine-lesioned mouse as a model for assessing functional effects of neuronal grafting. *Brain Res* 366: 346-349

Brundin P, Barker RA, Parmar M (2010) Neural grafting in Parkinson's disease: problems and possibilities. *Prog Brain Res* 184: 265-294

Cedarbaum JM, Gandy SE, McDowell FH (1991) "Early" initiation of levodopa treatment does not promote the development of motor response fluctuations, dyskinesias, or dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 41: 622–629

Chade AR, Kasten M, Tanner CM (2006) Nongenetic causes of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 70: 147–151

Chase TN, Oh JD, Konitsiotis S (2000) Antiparkinsonian and antidyskinetic activity of drugs targeting central glutamatergic mechanisms. *J Neurol* 247: 1136-1142

Chaturvedi RK, Agrawal AK, Seth K, Shukla S, Chauhan S, Shukla Y, Sinha C, Seth PK (2003) Effect of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) cotransplantation with fetal ventral mesencephalic cells (VCM) on functional restoration in 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesioned rat model of Parkinson's disease: Neurobehavioral, neurochemical and immunohistochemical studies. *Int J Devl Neurosci* 21: 391-400

Literaturverzeichnis

Cummings JL (1997) Parkinson's disease and Parkinsonism. In: Joseph AB, Young RR (Hrsg.): Movement disorders in neurology and neuropsychiatry. Blackwell Scientific Publication, Oxford, London: 195-203

Darmopil S, Muñetón Gómez VC, De Ceballos M, Bernson M, Moratalla R (2008) Tyrosine hydroxylase cells appearing in the mouse striatum after dopamine denervation are likely to be projection neurones regulated by L-DOPA. *Eur J Neurosci* 27: 580-592

Dawson TM, Mandir AS, Lee MK (2002) Animal models of PD: Pieces of the same puzzle? *Neuron* 35: 219-222

Dawson TM, Ko HS, Dawson VL (2010) Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. *Neuron* 66: 646-661

Dehay B, Bezard E (2011) New animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26: 1198-1205

Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Schapira AHV, Jenner P, Marsden CD (1994) Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* 35: 38–44

Di Porzio U, Zuddas A, Cosenza-Murphy DB, Barker J (1990) Early appearance of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells in the mesencephalon of mouse embryos. *Int J Dev Neurosci* 8: 523-532

Dolbeare F (1995) Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J* 27: 339-369

Donkelaar HJ, Lammens M, Wesseling P, Hori A, Keyser A, Rotteveel J (2004) Development and malformations of the human pyramidal tract. *J Neurol* 251: 1429-1442

Literaturverzeichnis

Dowd E, Monville C, Torres EM, Dunnett, SB (2005) The Corridor Task: a simple test of lateralised response selection sensitive to unilateral dopamine deafferentation and graft-derived dopamine replacement in the striatum. *Brain Res Bull* 68: 24–30

Du X, Stull ND, Iacovitti L (1995) Brain-derived neurotrophic factor works coordinately with partner molecules to initiate tyrosine hydroxylase expression in striatal neurons. *Brain Res* 680: 229-233

Follett KA (2004) Comparison of pallidal and subthalamic deep brain stimulation for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Neurosurg Focus* 17: 14-19

Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, Schneck SA, Kriek E, Qi JX, (1992) Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 327: 1549–1555

Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344: 710–719

Gerlach M, Riederer P, Przuntek H, Youdim MBH (1991) MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* 208: 273–286

Gerlach M, Gsell W, Kornhuber J, Jellinger K, Krieger V, Pantucek F, Vock R, Riederer P (1996) A post mortem study on neurochemical markers of dopaminergic, GABA-ergic and glutamatergic neurons in basal ganglia thalamocortical circuits in Parkinson's syndrome. *Brain Res* 741: 142–152

Gerlach M, Riederer P (1999) MAO-B-Hemmer: Einleitung, Allgemeine Pharmakologie, Neurobiochemie und Wirkmechanismus von Selegilin. In: Riederer P, Laux G, Pödingner W (Hrsg) *Neuro-Psychopharmaka*, Bd 5: Parkinson-Mittel und Antidementiva. 2. neu bearb. Aufl., Springer Wien NewYork: 169–188

Literaturverzeichnis

Gerlach M, van den Buuse M, Blaha C, Bremen D, Riederer P (2004) Entacapone increases and prolongs the central effects of L-DOPA in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370: 388–394

Gerlach M, Reichmann H, Riederer P (Hrsg) (2007) Die Parkinson-Krankheit Grundlagen, Klinik, Therapie. 4. Auflage, Springer Wien NewYork: pp 8-28, 137-165, 197f, 210-217, 223-225, 263f

Glinka Y, Youdim MBH (1995) Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydop-amine. *Eur J Pharmacol* 292: 329–332

Glinka Y, Gassen M, Youdim MBH (1997). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm* 50: 55–66

Grealish S, Mattsson B, Draxler P, Björklund A (2010) Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 31: 2266-2278

Haas SJP (2009) Charakterisierung neuraler Stammzellen (CSM14.1-Zellen) *in vitro* und *in vivo* nach Transplantation in das Striatum von Hemiparkinson-Ratten. Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock

Halliday GM, Li YW, Blumbergs PC, Joh TH, Cotton RG, Howe PR, Blessing WW, Geffen LB (1990) Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 27: 373-385

Hagell P and Brundin P (2001) Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease. *JNEN* 60: 741–752

Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97: 1634–1658

Hassler R (1938) Zur Pathologie der Paralysis agitans and des postenzephalitischen

Literaturverzeichnis

Parkinsonismus. J Psychol Neurol 48: 387-476

Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, Nauert M, Gauger L, Kordower JH (1999) Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. Arch Neurol 56: 179–187

Haycock JW (2002) Species differences in the expression of multiple tyrosine hydroxylase protein isoforms. J Neurochem 81: 947-953

Herzog J, Deuschl G, Volkmann J (2003) Die tiefe Hirnstimulation in der Therapie des idiopathischen Parkinson-Syndroms. Dtsch Z Nervenheilkd 22: 498-503

Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. Nat Neurosci 7: 726–735

Hovakimyan M, Haas SJ, Schmitt O, Gerber B, Wree A, Andressen C (2006) Mesencephalic human neural progenitor cells transplanted into the neonatal hemiparkinsonian rat striatum differentiate into neurons and improve motor behaviour. J Anat 209: 721-732

Hsu SM, Raine L (1981a) Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 29: 1349-1353

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981b) The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. Am J Clin Pathol 75: 816-821

Hudson JL, van Horne CG, Strömberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1993) Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigro-striatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. Brain Res 626: 167-174

Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G (2005) Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. Behav Brain Res 162: 1-10

Literaturverzeichnis

Ibáñez-Sandoval O, Tecuapetla F, Unal B, Shah F, Koós T, Tepper JM (2010) Electrophysiological and morphological characteristics and synaptic connectivity of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in adult mouse striatum. *J Neurosci* 30: 6999-7016

Ikemoto K, Kitahama K, Jouvet A, Arai R, Nishimura A, Nishi K, Nagatsu I (1997) Demonstration of L-dopa decarboxylating neurons specific to human striatum. *Neurosci Lett* 232: 111-114

Jellinger K, Paulus W (1991) Bedeutung der Nigraveränderungen bei Parkinson-Syndromen. In: Fischer P (Hrsg) *Parkinson-Krankheit und Nigraprozess*. Basel/Grenzach-Whylen, Editiones <Roche>: 3–28

Jellinger KA (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14: 153–197

Jellinger KA (1999) Post mortem studies in Parkinson's disease – is it possible to detect brain areas for specific symptoms? *J Neural Transm* 56: 1–29

Jenner P (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53: 26-36

Jones BJ, Roberts DJ (1968) The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol* 20: 302-304

Kempermann G (2006) *Adult Neurogenesis - Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain*. Oxford University Press, New York: 226, 350

Kleiner-Fisman G, Lozano A, Moro E, Poon YY, Lang AE (2010) Long-term effect of unilateral pallidotomy on levodopa-induced dyskinesia. *Mov Disord* 25: 1496-1498

Kolls B, Stacy M (2005) Apomorphine: an overview of clinical use. *Aging Health* 1: 193–202

Literaturverzeichnis

Kraft AD, Harry GJ (2011) Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health* 8: 2980-3018

Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM (2007) Bromodeoxyuridine and the detection of neurogenesis. *Curr Pharm Biotechnol* 8: 127-131

Landgren H, Curtis MA (2011) Locating and labeling neural stem cells in the brain. *J Cell Physiol* 226: 1-7

Lee MK, Stirling W, Xu YQ, Xu XY, Qui D, Mandir AS, Dawson TM, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL (2002) Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 -> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8968–8973

LeWitt PA (2004) Subcutaneously administered apomorphine: pharmacokinetics and metabolism. *Neurology* 62: 8–11

Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R (1990) Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247: 574–577

Lindvall O, Sawle G, Widner H, Rothwell JC, Bjorklund A, Brooks D (1994) Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann Neurol* 35: 172–180

Lindvall O, Hagell P (2002) Neural and stem cell transplantation. In: Jankovic JJ, Tolosa E (Hrsg): *Parkinson's disease and movement disorders*. 4. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York: 663-673

Lopez-Real A, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2003) Localization and functional significance of striatal neurons immunoreactive to aromatic L-amino acid decarboxylase or tyrosine hydroxylase in rat Parkinsonian models. *Brain Res* 969: 135-146

Literaturverzeichnis

Lundblad M, Picconi B, Lindgren H, Cenci MA (2004) A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis* 16: 110-123

Ma Y, Feigin A, Dhawan V, Fukuda M, Shi Q, Greene P (2002) Dyskinesia after fetal cell transplantation for parkinsonism: A PET study. *Ann Neurol* 52: 628–634

Ma Y, Tang C, Chaly T, Greene P, Breeze R, Fahn S (2010) Dopamine cell implantation in Parkinson's disease: Long-term clinical and (18)F-FDOPA PET outcomes. *JNM* 51: 7–15

Magen I, Chesselet MF (2010) Genetic mouse models of Parkinson's disease: The state of the art. *Prog Brain Res* 184: 53-87

Manfredi G (2006) mtDNA clock runs out for dopaminergic neurons. *Nat Genet* 38: 507–508

Marín-Teva JL, Cuadros MA, Martín-Oliva D, Navascués J (2012) Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol* 1: 1-16

Marsden CD (1982) Basal ganglia disease. *Lancet* 2: 1141-1147

Marshall JF, Richardson JS, Teitelbaum P (1974) Nigrostriatal bundle damage and the lateral hypothalamic syndrome. *J Comp Physiol Psychol* 87: 808–830

Marshall JF, Ungerstedt U (1977) Supersensitivity to apomorphine following destruction of the ascending dopamine neurons: Quantification using the rotational model. *Eur J Pharmacol* 41: 351-367

Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagar Y, Sisk A, Muck L (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: Implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287: 1265–1269

Literaturverzeichnis

Masuda M, Miura M, Inoue R, Imanishi M, Saino-Saito S, Takada M, Kobayashi K, Aosaki T (2011) Postnatal development of tyrosine hydroxylase mRNA-expressing neurons in mouse neostriatum. *Eur J Neurosci* 34: 1355-1367

Mazloom M, Smith Y (2006) Synaptic microcircuitry of tyrosine hydroxylase-containing neurons and terminals in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys. *J Comp Neurol* 495: 453-469

McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory Slechta DA, Di Monte DA (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: Selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis* 10: 119–127

McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38: 1285–1291

McIntyre CC, Savasta M, Walter BL, Vitek JL (2004) How does deep brain stimulation work? Present understanding and future questions. *J Clin Neurophysiol* 21: 40-50

McNeely W, Davis R (1997) Entacapone. *CNS Drugs* 8: 79–88

Melamed E, Zoldan J, Galili-Mosberg R, Ziv I, Djaldetti R (2000) Current management of motor fluctuations in patients with advanced Parkinson's disease treated chronically with levodopa. In: Przuntek H, Müller T (Hrsg.): *Diagnosis and treatment of Parkinson's disease – State of the Art*. Springer Wien NewYork: 173-183

Mellick CD (2006) CYP450, genetics and Parkinson's disease: gene x environment inter-actions hold the key. *J Neural Transm* 70: 159–165

Meredith GE, Farrell T, Kellaghan P, Tan Y, Zahm DS, Totterdell S (1999) Immunocytochemical characterization of catecholaminergic neurons in the rat striatum following dopamine-depleting lesions. *Eur J Neurosci* 11: 3585-3596

Literaturverzeichnis

Meyers AR (Editor) (1996) Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine, Vol. 1, VCH-Verlag Weinheim, New York, Basel, Cambridge

Montastruc JL, Rascol O, Senard JM, Rascol A (1994) A randomised controlled study comparing bromocriptine to which levodopa was later added, with levodopa alone in previously untreated patients with Parkinson's disease: A five year follow up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57: 1034–1038

Myllylä VV, Sotaniemi KA, Hakulinen P, Maki-Ikola O, Heinonen EH (1997) Selegiline as the primary treatment of Parkinson's disease – a longterm double-blind study. *Acta Neurol Scand* 95: 211–218

Nieuwenhuys R, Donkelaar HJ, Nicholson C (1998) The central nervous system of vertebrates. Vol. 3, Springer; Berlin, Heidelberg

Nowak RM (1999) Walker's mammals of the world. 6. Auflage, Johns Hopkins University Press, Baltimore

Oertel WH, Deuschl G, Gasser T, Eggert K, Arnold G, Baas H, Przuntek H, Reichmann H, Riederer P, Spieker S, Trenkwalder C (2003) Parkinson-Syndrome. In: Diener HC (Hrsg) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Thieme, Stuttgart: 38-58

Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54: 403–414

Pan MK, Tai CH, Kuo CC (2010) Parkinson's disease and cortico-basal Ganglia circuits. *Acta Neurol Taiwan* 19: 213-222

Parkinson J (1817) An Essay on the Shaking Palsy. Sherwood, Neely and Jones, London

Paxinos G, Franklin KBJ (2001) The Mouse Brain in Stereotactic Coordinates. Second edition, Academic Press, San Diego

Literaturverzeichnis

Pedersen V (2001) Verhaltenspharmakologische und histologische Charakterisierung der Funktion von Dopamin und Glutamat bei der „nigralen“ und „extranigralen“ Pathologie in einem Tiermodell der Parkinson-Krankheit. Dissertation der Biologischen Fakultät der Universität Tübingen

Pellegrino D, Cicchetti F, Wang X, Zhu A, Yu M, Saint-Pierre M, Brownell AL (2007) Modulation of dopaminergic and glutamatergic brain function: PET studies on parkinsonian rats. *J Nucl Med* 48: 1147-1153

Poewe WH (1993) Die Neuropsychologie der Parkinson-Krankheit. In: Stern GM, Madeja UD, Poewe WH (Hrsg) Trends in Diagnostik und Therapie des Morbus Parkinson. Berlin, de Gruyter: 43–49

Porritt MJ, Batchelor PE, Hughes AJ, Kalnins R, Donnan GA, Howells DW (2000) New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. *Lancet* 356: 44f

Ransohoff RM and Cardona AE (2010) The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468: 253-262

Rascol O, Goetz C, Koller W, Poewe W, Sampaio C (2002) Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. *Lancet* 359: 1589-1598

Reichmann H, Riederer P (1989) Biochemical analyses of respiratory chain enzymes in different brain regions of patients with Parkinson's disease. BMFT Symposium „Morbus Parkinson und andere Basalganglienerkrankungen“, Bad Kissingen

Reichmann H, Goßrau G, Sommer U (2003) Neue Ansätze zur Transplantation von Dopamin produzierenden Zellen und Stammzellen. *Nervenarzt* 74: 22-26

Riess O, Kruger R, Hochstrasser H, Soehn AS, Nuber S, Franck T, Berg D (2006) Genetic causes of Parkinson's disease: extending the pathway. *J Neural Transm* 70: 181–189

Literaturverzeichnis

Ross BM, Mamalias N, Moszczynska A, Rajput AH, Kish SJ (2001) Elevated activity of phospholipid biosynthetic enzymes in substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience* 102: 899–904

Ross OA, Toft M, Whittle AJ, Johnson JL, Papapetropoulos S, Mash DC, Litvan I, Gordon MF, Wszolek ZK, Farrer MJ, Dickson DW (2006) Lrrk2 and Lewy body disease. *Ann Neurol* 59: 388–393

Sauer H, Oertel WH (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neuroscience* 59: 401-415

Schallert T, Tillerson JL (1999) Intervention strategies for degeneration of dopamine neurons in Parkinsonism. *Central nervous system disease*, Humana Press Inc., Totowa: 131-151

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54: 823–827

Schmidt RH, Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Gage FH (1983) Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. III. Activity of intrastriatal nigral suspension implants as assessed by measurements of dopamine synthesis and metabolism. *Acta Physiol Scand* 522: 19-28

Sheehan JP, Swerdlow RH, Parker WD, Miller SW, Davis RE, Tuttle JB (1997) Altered calcium homeostasis in cells transformed by mitochondria from individuals with Parkinson's disease. *J Neurochem* 68: 1221–1233

Sofic E, Riederer P, Heinsen H, Beckmann H, Reynolds GP, Hebenstreit G, Youdim MB (1988) Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm* 74: 199–205

Literaturverzeichnis

Sommer U, Hummel T, Cormann K, Mueller A, Frasnelli J, Kropp J, Reichmann H (2004) Detection of presymptomatic Parkinson's disease: combining smell tests, transcranial sonography, and SPECT. *Mov Disord* 19: 1196-1202

Tandé D, Höglinger G, Debeir T, Freundlieb N, Hirsch EC, François C (2006) New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. *Brain* 129: 1194-1200

Taylor TN, Greene JG, Miller GW (2010) Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 211: 1-10

Tepper JM, Tecuapetla F, Koós T, Ibáñez-Sandoval O (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat* 4: article 150

The Parkinson Study Group (1993) Effects of Tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N Engl J Med* 328: 176–184

The Parkinson Study Group (2002) A controlled trial of rasagiline in early Parkinson's disease: the TEMPO study. *Arch Neurol* 59: 1937–1943

Thompson LH, Grealish S, Kirik D, Björklund A (2009) Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci* 30: 625-638

Tintner R, Jankovic J (2002) Treatment options for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 15: 467-476

Tipton KF, Singer TP (1993) Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem* 61: 1191-1206

Toda H, Hamani C, Lozano A (2004) Deep brain stimulation in the treatment of dyskinesia and dystonia. *Neurosurg Focus* 17: 9-13

Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxydopamine-induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5: 107–110

Literaturverzeichnis

Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal system. *Brain Res* 24: 485-493

Ungerstedt U (1971) Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand* 367: 95–122

Vanderlaan M, Thomas CB (1985) Characterization of monoclonal antibodies to bromodeoxyuridine. *Cytometry* 6: 501-505

Von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R (2005) Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 15: 473-490

Von Voigtlander PF, Moore KE (1973) Turning Behavior of mice with unilateral 6-hydroxydopamine lesions in the striatum effects of apomorphine, L-dopa, amantadine, amphetamine and other psychomotor stimulants. *Neuropharmacology* 12: 451-462

West AB, Dawson VL, Dawson TM (2007) The Role of Parkin in Parkinson's Disease. In: T.M. Dawson (ed.) *Parkinson's Disease: Genetics and Pathogenesis*. New York, Informa Healthcare USA, Inc.: 199–218

West MJ, Ostergaard K, Andreassen OA, Finsen B (1996) Estimation of the number of somatostatin neurons in the striatum: an in situ hybridization study using the optical fractionator method. *J Comp Neurol* 370: 11-22

Yang HK, Sundholm-Peters NL, Goings GE, Walker AS, Hyland K, Szele FG (2004) Distribution of doublecortin expressing cells near the lateral ventricles in the adult mouse brain. *J Neurosci Res* 76: 282-295

Zigmond MJ, Stricker EM (1989) Animal models of Parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. In: Smythies JR, Bradley RJ (Eds) *International Review of Neurobiology*, Vol 31, San Diego/New York/Berkely/Boston/London/Sydney/Tokyo/Toronto, Academic Press: 10–79

Literaturverzeichnis

Zuch CL, Nordtroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC (2000) Time course of degenerative alterations of nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. J Comp Neurol 427: 440-454

Anhang

6 Anhang

Zu Material und Methoden 2.6.4 Protokoll BrdU-TH-Doppelmarkierung

Erstes Epitop

- 30 µm dicke Hirnschnitte in Kryoprotektionslösung
- 10 min in PBS waschen
- Peroxidasebehandlung: 15 min 3% H₂O₂, gelöst in PBS bei RT
- Waschen: 2 x 5 min in PBS
- DNA-Denaturierung:
 - 1: 2 h in 50% Formamid / 2x SSC bei 65°C
 - 2: 5 min in 2 x SSC bei RT
 - 3: 30 min in 2N HCl bei 37°C (39,6 ml Aqua dest. 10,4 ml 37% HCl)
 - 4: 10 min in 0,1 M Borsäure (pH 8,5)
 - 5: 3 x 10min in PBS bei RT
- Abblocken unspezifischer Bindungsstellen 1 h bei RT (150 µl/Well):
PBS: 0,05% Triton und 3% Normal Rabbit Serum (NRS)
- Erstantikörperinkubation: über Nacht bei 4°C (150 µl/Well):
PBS, 0,025% Triton und 1% NRS und Anti-BrdU (rat AbD Serotec, 1:500)
- Waschen: 3 x 5 min in PBS
- Zweitantikörperinkubation: 2 h (bei RT) (150 µl/Well):
PBS, 0,025% Triton, 1% NRS und biotinyliertes Anti-Rat von Vector (aus rabbit)
1:200
- ABC-Komplex ansetzen (ABC-Vectastain Kit[®]) (150 µl/Well):
bei 5 ml PBS, je 100 µl-Lösung A und B zugeben (Endverdünnung 1:50) und
mindestens 30 min miteinander reagieren lassen
- Waschen: 3 x 10 min in PBS
- Inkubation des ABC-Komplexes, 1 h bei RT
- Waschen: 3 x 10 min in PBS
- DAB- Fällung (schwarz):
Zeit 3-4 min bei RT unter mikroskopischer Kontrolle: 5 ml PBS und 150 µl
Chromogen und 150 µl Hydrogen-Peroxid
- Waschen: 3 x 10 min in PBS/TRIS

Zweites Epitop

- Abblocken unspezifischer Bindungsstellen 1 h bei RT (150 µl/Well):

Anhang

PBS: 0,05% Triton und 3% Normal Rabbit Serum (NRS) aus sheep-Kit

- Erstantikörperinkubation: über Nacht bei 4°C (150 µl/Well):

PBS, 0,025% Triton und 1% NRS und Anti-TH (sheep, 1:1000, Chemicon)

- Waschen: 3 x 5 min in PBS

- Zweitantikörperinkubation: 3 h (bei RT) (150 µl/Well):

PBS, 0,025% Triton, 1% NRS und biotinyliertes Anti-sheep von Vector (aus rabbit, Sheep-Vectastain Kit) 1:200

- ABC-Komplex ansetzen (Sheep-Vectastain Kit[®]) (150 µl/Well):

bei 5 ml PBS, je 100 µl-Lösung A und B zugeben (Endverdünnung 1:50) und mindestens 30 min miteinander reagieren lassen

- Waschen: 3 x 10 min in PBS (in der Zeit in der ABC-reagiert)

- Inkubation des ABC-Komplexes, 1 h bei RT

- Waschen: 3 x 10 min in PBS

- DAB- Fällung (braun): 10-14 min bei RT unter mikroskopischer Kontrolle: 10 mg DAB, 100 ml PBS und 1 µl H₂O₂ (35%)

- Waschen: 10 min in PBS

- Waschen: 5 min in A. dest

- auf SuperfrostPlus-Objektträger aufziehen und über Nacht trocknen lassen

- Aufsteigende Alkoholreihe (je 3 min in 70-, 90-, 95- & 100% Propanol)

- 10 min in Xylolbad (unter Abzug mit Handschuhen)

- Eindeckeln in Vitro Clud[®] (Xylolhaltig, Handschuhe & Abzug)

Zu Ergebnisse 3.1 Zylindertest

Einen Monat postlesionem:

Maus	rechts	links	prozentual rechts
4	20	10	66,67
5	20	10	66,67
13	21	9	70
14	16	14	53,33
16	18	12	60
20	22	8	73,33
23	18	12	60

Anhang

24	22	8	73,33
Mittelwerte gerundet	19,6	10,4	65,4
SEM gerundet	2,1	2,1	7,1

Zwei Monate postlesionem:

Maus	rechts	links	prozentual rechts
4	19	11	63,33
5	19	11	63,33
13	24	6	80
14	20	10	66,67
16	25	5	83,33
20	21	9	70
23	23	7	76,67
24	19	11	63,33
Mittelwerte gerundet	21,3	8,8	70,8
SEM gerundet	2,4	2,4	8,1

Drei Monate postlesionem:

Maus	rechts	links	prozentual rechts
4	22	8	73,33
5	24	6	80
13	21	9	70
14	14	16	46,67
16	21	9	70
20	19	11	63,33
23	19	11	63,33
24	22	8	73,33
Mittelwerte gerundet	20,3	9,8	67,5

Anhang

SEM gerundet	3	3	10
--------------	---	---	----

Drei Monate alte, gesunde Kontrollmäuse:

Maus	rechts	links	prozentual rechts
184	15	15	50
185	20	10	66,67
186	15	15	50
187	13	17	43,33
188	17	13	56,67
190	16	14	53,33
191	17	13	56,67
192	16	14	53,33
Mittelwerte gerundet	16,1	13,9	53,8
SEM gerundet	2	2	6,8

Statistik – nicht-parametrischer U-Test:

Zylindertest – Kontrolle vs 1 Mo	
Mann-Whitney-U	7,000
Wilcoxon-W	43,000
Z	-2,649
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,008
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,007

Zylindertest – Kontrolle vs 2 Mo	
Mann-Whitney-U	3,500
Wilcoxon-W	39,500
Z	-3,011
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,003
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,001

Anhang

Zylindertest – Kontrolle vs 1 Mo	
Mann-Whitney-U	9,000
Wilcoxon-W	45,000
Z	-2,426
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,015
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,015

Zu Ergebnisse 3.2 Apomorphin-Rotationstest

Tier	Rot/min	Rot/min	Rot/min	Rot/min	Kontrolltier
	1Mo p.l.	2Mo p.l.	3Mo p.l.	Kontrolle	
4	4,7	13,9	14,3	0,2	7625
5	4,9	12,5	16,4	0,08	7452
13	3	11,9	18,2	-0,2	7126
14	8,5	20	19,3	0,2	7106
16	10,7	19,7	17	0,1	8855
20	13,1	23,7	23,7	1,3	6815
23	9,1	18,9	22,2	-	-
24	7,3	13,9	19,5	-	-
Mittelwert gerundet	7,7	16,8	18,8	0,28	-
SEM gerundet	3,4	4,3	3,1	0,5	-

Statistik – nicht-parametrischer U-Test:

Apomorphinrotationstest – Kontrolle vs 1 Mo	
Mann-Whitney-U	0,000
Wilcoxon-W	21,000
Z	-3,102
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,002
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,001

Apomorphinrotationstest – Kontrolle vs 2 Mo	
Mann-Whitney-U	0,000

Anhang

Wilcoxon-W	21,000
Z	-3,105
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,002
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,001

Apomorphinrotationstest – Kontrolle vs 3 Mo	
Mann-Whitney-U	0,000
Wilcoxon-W	21,000
Z	-3,102
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,002
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,001

Apomorphinrotationstest – 2 Mo vs 3 Mo	
Mann-Whitney-U	23,500
Wilcoxon-W	59,500
Z	-0,894
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,371
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,382

Zu Ergebnisse 3.3 Immunhistochemie – BrdU/TH-„double labeling“

Daten File	Marker	Total Markers counted	Region	Total cell number	Zeit nach Läsion	Läsionszustand
Versuchsgruppe 1						
lesion-ri-1-2010	All	641	Stri ri	38761	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-6-2010	All	1261	Stri ri	76252	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-7-2010	All	1071	Stri ri	64763	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-8-2010	All	906	Stri ri	54785	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-9-2010	All	690	Stri ri	41724	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-10-2010	All	272	Stri ri	16448	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-11-2010	All	817	Stri ri	49404	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-12-2010	All	522	Stri ri	31565	3 Tage	läsioniert

Anhang

lesion-ri-17-2010	All	553	Stri ri	33440	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-1-2010	BrdU	577	Stri ri	34891	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-6-2010	BrdU	1158	Stri ri	70024	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-7-2010	BrdU	928	Stri ri	56116	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-8-2010	BrdU	836	Stri ri	50553	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-9-2010	BrdU	613	Stri ri	37068	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-10-2010	BrdU	247	Stri ri	14936	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-11-2010	BrdU	710	Stri ri	42933	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-12-2010	BrdU	427	Stri ri	25821	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-17-2010	BrdU	462	Stri ri	27937	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-1-2010	BrdU	140	Stri le	8466	3 Tage	nicht läsioniert
lesion-ri-6-2010	BrdU	101	Stri le	6107	3 Tage	nicht läsioniert
lesion-ri-7-2010	BrdU	117	Stri le	7075	3 Tage	nicht läsioniert
lesion-ri-8-2010	BrdU	68	Stri le	4112	3 Tage	nicht läsioniert
lesion-ri-9-2010	BrdU	72	Stri le	4354	3 Tage	nicht läsioniert
lesion-ri-10-2010	BrdU	87	Stri le	5261	3 Tage	nicht läsioniert
lesion-ri-11-2010	BrdU	105	Stri le	6349	3 Tage	nicht läsioniert
lesion-ri-12-2010	BrdU	62	Stri le	3749	3 Tage	nicht läsioniert
lesion-ri-17-2010	BrdU	134	Stri le	8103	3 Tage	nicht läsioniert
lesion-ri-1-2010	TH	64	Stri ri	3870	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-6-2010	TH	103	Stri ri	6228	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-7-2010	TH	143	Stri ri	8647	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-8-2010	TH	70	Stri ri	4233	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-9-2010	TH	77	Stri ri	4656	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-10-2010	TH	25	Stri ri	1512	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-11-2010	TH	107	Stri ri	6470	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-12-2010	TH	95	Stri ri	5745	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-17-2010	TH	91	Stri ri	5503	3 Tage	läsioniert
lesion-ri-4-2010	All	351	Stri ri	21225	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-5-2010	All	414	Stri ri	25034	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-13-2010	All	436	Stri ri	26365	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-14-2010	All	354	Stri ri	21406	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-16-2010	All	358	Stri ri	21648	3 Mo	läsioniert

Anhang

lesion-ri-20-2010	All	432	Stri ri	26123	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-23-2010	All	416	Stri ri	25155	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-24-2010	All	435	Stri ri	26304	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-4-2010	BrdU	316	Stri ri	19108	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-5-2010	BrdU	312	Stri ri	18867	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-13-2010	BrdU	371	Stri ri	22434	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-14-2010	BrdU	243	Stri ri	14694	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-16-2010	BrdU	311	Stri ri	18806	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-20-2010	BrdU	361	Stri ri	21830	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-23-2010	BrdU	329	Stri ri	19895	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-24-2010	BrdU	348	Stri ri	21043	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-4-2010	BrdU	21	Stri le	1270	3 Mo	nicht läsioniert
lesion-ri-5-2010	BrdU	38	Stri le	2298	3 Mo	nicht läsioniert
lesion-ri-13-2010	BrdU	36	Stri le	2177	3 Mo	nicht läsioniert
lesion-ri-14-2010	BrdU	42	Stri le	2540	3 Mo	nicht läsioniert
lesion-ri-16-2010	BrdU	156	Stri le	9433	3 Mo	nicht läsioniert
lesion-ri-20-2010	BrdU	73	Stri le	4414	3 Mo	nicht läsioniert
lesion-ri-23-2010	BrdU	86	Stri le	5200	3 Mo	nicht läsioniert
lesion-ri-24-2010	BrdU	53	Stri le	3205	3 Mo	nicht läsioniert
lesion-ri-4-2010	TH	35	Stri re	2116	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-5-2010	TH	102	Stri re	6168	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-13-2010	TH	65	Stri re	3931	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-14-2010	TH	111	Stri re	6712	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-16-2010	TH	47	Stri re	2842	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-20-2010	TH	71	Stri re	4293	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-23-2010	TH	87	Stri re	5261	3 Mo	läsioniert
lesion-ri-24-2010	TH	87	Stri re	5261	3 Mo	läsioniert

Anhang

Statistik – nicht-parametrischer U-Test:

BrdU – läsiert 3 d vs 3 Mo	
Mann-Whitney-U	7,000
Wilcoxon-W	43,000
Z	-2,791
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,005
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,004

TH – läsiert 3 d vs 3 Mo	
Mann-Whitney-U	29,000
Wilcoxon-W	65,000
Z	-0,674
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,500
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,541

7 Thesen

1. Die experimentelle Nutzung des 6-OHDA-Modells der Ratte gilt als etabliertes Verfahren zur Darstellung eines fortgeschrittenen Stadiums der PD. Die Übertragung dieses Modells auf die Maus, zum Beispiel zur Nutzung transgener Tiere, zeigt trotz starker Artverwandtschaft bisher nicht bekannte neurobiologische und biochemische Reaktionen.
2. Bei unilateral 6-OHDA-läsionierten Mäusen treten drei Tage nach der Läsion im Striatum der läsionierten Seite TH-positive Zellen auf.
3. Die TH-positiven Zellen sind kein Ergebnis adulter Neurogenese, sondern legen vielmehr einen phänotypischen Wechsel („phenotypic shift“) von vorhandenen Neuronen nahe.
4. Die Anzahl TH-positiver Zellen im Striatum der läsionierten Hemisphäre ist innerhalb von drei Monaten nahezu konstant.
5. Im Zeitraum von drei Monaten sind die Zahl BrdU-positiver Zellen im Striatum der nicht-läsionierten Hemisphäre als konstant anzusehen, wohingegen im gleichen Gebiet der läsionierten Hemisphäre eine deutliche Abnahme bei mehr als siebenfach höherem Ausgangswert zu beobachten ist. Dies ist primär als läsionsbedingte Reaktion des Gewebes zu werten.
6. Die Anwesenheit TH-immunreaktiver Neurone im einseitig deafferentierten Striatum führt unabhängig von deren Anzahl zu keiner motorisch-funktionellen Besserung der Symptomatik der Parkinsonschen Erkrankung.
7. Die nachgewiesenen TH-immunreaktiven Neurone sind trotz des entsprechenden Schrittmacherenzym nicht in der Lage Dopamin in funktionell wirksamen Mengen zu produzieren.

Erklärung

8 Erklärung

Die vorgelegte Dissertation wurde weder vorher noch gleichzeitig bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe - außer der Personen, denen im Kapitel 10 gedankt wurde - verfasst und ich andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die wörtlich oder inhaltlich verwendeten Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass ich noch kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Rostock, August 2012

.....

Martin Duckert

Lebenslauf

9 Lebenslauf

Name: Martin Duckert
Geburtsdatum: 10.04.1987
Geburtsort: Schwedt/Oder
Familienstand: Ledig
Anschrift: Lüneburger Straße 15, 18057 Rostock
Kontakt: martin.duckert@uni-rostock.de
Eltern: Carola Duckert (geb. Schwantuschke)
Erhard Duckert

Bildungsweg:

- August 1993 – Juni 1999 „Grundschule Pinnow“
- August 1999 – Juni 2006 „Einstein-Gymnasium“ Angermünde
- 01.07.2006 – 31.03.2007 Sanitätsdienst der Bundeswehr
- 01.04.2007 – 30.06.2007 Praktikum im Asklepios Klinikum Schwedt/Oder
- seit Oktober 2007 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock

Famulaturen:

- 01.08.2010 – 15.08.2010 Chirurgische Praxis DM H. Rohde in Schwedt/Oder
- 16.08.2010 – 15.09.2010 Neurochirurgie an der Universität Rostock
- 14.02.2011 – 28.02.2011 Palliativstation an der Universität Rostock
- 06.03.2011 – 20.03.2011 Internistisch-Hausärztliche Praxis Dr. H. Golatowski in Güstrow
- 01.08.2011 – 15.08.2011 Internistische Hämatologie und Onkologie im Asklepios Klinikum Schwedt/Oder
- 17.08.2011 – 31.08.2011 Hämatologie und Onkologie an der Universität Rostock
- 13.02.2012 – 27.02.2012 Palliativstation an der Universität Rostock

Publikationen

10 Publikationen

Duckert M, Schmitt O, Wree A, Haas SJP (2010):

Nigral 6-OHDA-lesion in mice leads to a phenotypic shift of striatal neurons into tyrosine hydroxylase containing cells.

Restorative Neurology and Neuroscience, 28: 680 (Abstract PP I-4)

Haas SJP, **Duckert M**, Hilla A, Schmitt O, Wree A (2011):

6-ohda-injection into the nigrostriatal pathway of mice leads to a phenotypic shift of striatal neurons into tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons.

Proceedings 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society: Abstract T3-1A

Spittau B, Zhou X, Haas S, **Duckert M**, Wree A, Krieglstein K (2011):

Analysis of alternative microglia activation in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson´s disease.

Annals of Anatomy, 193 (Abstract)

Danksagung

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Wree möchte ich für die Bereitstellung des Themas, Anschaffung der Rotometer und Durchführung der Läsion danken.

Herrn Prof. Dr. med. Schmitt sei im Besonderen für die Bearbeitung und Kontrolle des statistischen Teils dieser Arbeit, die Einführung in die PC-gestützte Zellzählung und –auswertung sowie für die Begutachtung dieser Arbeit gedankt.

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Haas für die intensive Betreuung der Arbeit, die Einführung in die Laborarbeit und Perfusionstechnik, die kontinuierliche Kontrolle dieses Schriftstückes und unzählige Ratschläge.

Herrn Dipl.-Biologen Hildebrandt und Frau Lehmann danke ich für die Einführung am Kryostaten.

Abschließend sei noch Frau Winzer für die Anfertigung der parallelen Nissl-Präparate gedankt.