

Aus dem Institut für Anatomie

der Universität Rostock

Direktor: Professor Dr. med. A. Wree

**Botulinum-Neurotoxin A-induzierte Varikositäten im  
Caudatus putamen der Ratte: eine quantitative  
Verlaufsstudie.**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Hans Brosig, geb. am 10.11.1988 in Greifswald

Rostock, 2013

Meinen Eltern, Geschwistern  
und den Bros

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter Prof. Dr. med. A. Wree, Institut für Anatomie Rostock

2. Gutachter Prof. Dr. med. R. Benecke, Klinik für Neurologie Rostock

3. Gutachter Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. K. Zilles, Forschungszentrum Jülich

Eingereicht: 26.03.2014

Datum der Verteidigung: 21.01.2015

## **Zusammenfassung**

Die Parkinsonerkrankung wurde erstmals im Jahre 1817 beschrieben und verdankt ihren Namen dem Erstbeschreiber James Parkinson. Diese Erkrankung zählt, direkt nach der Alzheimer-Erkrankung, zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen und ist gekennzeichnet durch eine Symptomkombination bestehend aus Rigor, Tremor, Akinese und posturaler Instabilität. Auch wenn sich hierbei die Störungen zunächst v.a. an großen Muskelgruppen bemerkbar machen, sind ebenfalls kleine Muskeln betroffen, welche beispielsweise für die Sprache und die Mimik verantwortlich sind. Neben weiteren Störungen wie Obstipation, Geruchsstörungen und vegetativen Funktionsstörungen, leiden die Betroffenen so auch unter der zunehmend erschwerten Kommunikation. Trotz all der Jahre besteht weiterhin Unklarheit bezüglich der Ursache der Entstehung des Morbus Parkinson. Sicher zu sein scheint nur, dass das Alter einen Hauptrisikofaktor der Erkrankung darstellt. Mit dem, im Rahmen des demographischen Wandels ablaufenden, Anstieg der Anzahl älterer Menschen, wird Morbus Parkinson in der Zukunft an Bedeutung zunehmen. Der Erkrankung liegt ein Untergang dopaminergischer striataler Afferenzen zugrunde, woraus eine relative Hyperaktivität cholinergischer Interneurone resultiert, welche die beschriebenen Beschwerden verursacht. Die Therapie dieser Erkrankung zielt darauf ab, entweder den Dopaminmangel auszugleichen oder den Hypercholinismus zu mindern. Ersteres wird derzeit durch die Gabe von Dopaminvorstufen oder von Hemmstoffen des Dopaminabbaus realisiert. Letzteres wird entweder mittels Antagonisten der striatalen Acetylcholinrezeptoren oder durch Hemmung der Acetylcholinausschüttung erreicht. Hierbei zeigen sich die, durch gramnegative, anaerobe Bakterien der Familie der Clostridien synthetisierten Botulinum Neurotoxine als besonders effektiv. Botulinum Neurotoxine gehören zu den giftigsten biologischen Neurotoxinen und wirken über die Spaltung von präsynaptischen Proteinen, die für die Transmitterexozytose von essentieller Bedeutung sind. Diese chemische Denervierung wird bereits bei einer Vielzahl von peripheren Erkrankungen, wie beispielsweise Dystonien, erfolgreich eingesetzt. Es zeigte sich darüber hinaus, dass diese Toxine im Tierversuch zum einen auch zentral eingesetzt werden können und zum anderen auf diese Weise auch über Monate hinweg wirken können, ohne das Verhalten der Tiere schwerwiegend zu beeinflussen. Ferner zeigten Tierversuche, dass Botulinum Neurotoxine bei einer striatalen Applikation nicht zytotoxisch sind. Jedoch zeigte sich bei der Untersuchung histologischer Hirnschnitte, dass es im zeitlichen Verlauf nach der Injektion von Botulinum Neurotoxin Typ A in das Striatum dort zur Ausbildung von Varikositäten an Nervenzellausläufern kommt. Kontrolltiere, welchen lediglich die Vehikelsubstanz injiziert wurde, wiesen derartige Veränderungen nicht auf. Die

Varikositäten sind sowohl bei Neuronen des cholinergen, als auch des dopaminergen Systems aufzufinden. Das mittlere Volumen dieser Varikositäten nimmt im zeitlichen Verlauf sowohl bei den cholinergen, als auch bei den dopaminergen Varikositäten zu. Im selben Verlauf ist bei diesen Varikositäten eine Abnahme der numerischen Dichte zu beobachten.

## Verwendete Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	
<b>ABC-Komplex</b>	Avidin/Biotinyl-Peroxidase-Complex
<b>AMPA-Rezeptor</b>	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid- Rezeptor
<b>BiVs</b>	Botulinum-Neurotoxin A-induzierte Varikositäten
<b>BoNT</b>	Botulinum Neurotoxin(e)
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>CD</b>	Cervicale Dystonie
<b>ChAT</b>	Cholinacetyltransferase
<b>CPu</b>	Caudatus putamen
<b>DA</b>	Dopamin
<b>DAA</b>	Dopaminrezeptoragonisten
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DBS</b>	Tiefe Hirnstimulation
<b>ET-1</b>	Endothelin - 1
<b>GABA</b>	Gamma-Aminobuttersäure
<b>GPe</b>	Globus Pallidus pars externa
<b>GPi</b>	Globus Pallidus pars interna
<b>HC</b>	Schwere Kette der BoNT
<b>HCC</b>	C-terminales Ende der schweren Kette der BoNT
<b>HCN</b>	N-terminales Ende der schweren Kette der BoNT
<b>IPS</b>	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
<b>IPSP</b>	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>LC</b>	Leichte Kette der BoNT
<b>L-Dopa</b>	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
<b>MAO-B</b>	Monoaminoxidase B
<b>NMDA-Rezeptor</b>	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
<b>NRS</b>	Normales Kaninchenserum
<b>PBS</b>	Phosphatpuffer
<b>SNAP-25</b>	Synaptosom-assoziiertes Protein-25 kDa
<b>SNARE</b>	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
<b>SNc</b>	Substantia nigra pars compacta
<b>SNr</b>	Substantia nigra pars reticulata
<b>STN</b>	Nucleus subthalamicus
<b>SV2</b>	synaptische Vesikelprotein 2
<b>TH</b>	Tyrosinhydroxylase
<b>VAMP-2</b>	Vesikel assoziiertes Membranprotein-2
<b>6-OHDA</b>	6-Hydroxydopamin

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
1.1 Die Parkinson-Erkrankung .....	3
1.1.1 Die Symptomatik der Parkinson-Erkrankung .....	3
1.1.2 Überlegungen zur Ätiologie des Morbus Parkinson.....	5
1.2 Die Parkinsonerkrankung und die Basalganglien .....	7
1.2.1 Die Basalganglien und ihre Vernetzung.....	7
1.2.2 Der Pfad der Bewegung.....	9
1.2.3 Dysfunktion der Basalganglien im Rahmen des Morbus Parkinson.....	11
1.3 Therapieoptionen der Parkinsonerkrankung .....	12
1.3.1 Verwendung der Dopaminvorstufe L-DOPA .....	12
1.3.2 Verwendung von Dopaminrezeptoragonisten.....	13
1.3.3 Verwendung von Monoaminoxidasehemmern .....	14
1.3.4 Therapie mittels operativer Eingriffe .....	14
1.3.5 Anwendung der tiefen Hirnstimulation.....	15
1.3.6 Verwendung von Anticholinergika .....	15
1.4 Botulinum Neurotoxine .....	16
1.4.1 Funktionsweise von Botulinum Neurotoxinen.....	16
1.4.2 BoNT als Therapieoption verschiedenster Erkrankungen.....	18
1.4.2.1 Therapie der Dystonie .....	18
1.4.2.2 Kosmetischer Einsatz von BoNT .....	19
1.4.2.3 Therapie der Epilepsie.....	20
1.4.2.4 Neuroprotektion bei ischämischen Schlaganfällen .....	20
1.4.2.5 Therapie von Schmerzen .....	21
1.4.2.6 Therapie des Morbus Parkinson.....	22
1.5 Fragestellung dieser Arbeit .....	23
2. Material und Methoden .....	25
2.1 Verwendete Tiere.....	25
2.2 Intrazerebrale Applikation von BoNT-A .....	25
2.3 Tötung der Tiere und Fixierung ihrer Gehirne.....	26
2.4 Anfertigung von histologischen Parallelschnitten der Versuchstiergehirne.....	26
2.5 Immunhistochemische Färbung .....	27
2.5.1 Anfärbung Cholinacetyltransferase (ChAT)-positiver Strukturen .....	27
2.5.2 Anfärbung Tyrosinhydroxylase (TH)-positiver Strukturen .....	29

2.5.3 Sortierung der Hirnschnitte.....	29
2.6 Stereotaktische Auswertung der BiVs .....	30
2.6.1 Zählung der BiVs für die anschließende Dichtebestimmung .....	30
2.6.2 Vermessung der Varikositäten und Ermittlung deren Volumens .....	33
2.6.3 Statistik.....	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1 Zeitliche Veränderungen der numerischen Dichte der ChAT-positiven BiVs.....	35
3.2 Zeitliche Veränderungen des Volumens der ChAT-positiven BiVs.....	36
3.3 Zeitliche Veränderungen der numerischen Dichte der TH-positiven BiVs.....	40
3.4 Zeitliche Veränderungen des Volumens der TH-positiven BiVs .....	41
4. Diskussion.....	45
4.1 Herkunft der Varikositäten.....	45
4.2 ChAT- und TH-positiv Varikositäten und ihr unterschiedliches Verteilungsmuster.....	49
4.3 Veränderung der numerischen Dichte und der mittleren Volumina der BiVs.....	51
4.4 Ausblick.....	53
5. Anhang.....	54
5.1 Tabellenanhang .....	54
5.2 Literaturverzeichnis.....	62
5.3 Veröffentlichungen.....	76
5.3.1 Posterbeiträge .....	76
5.4 Erklärung der eigenständigen Anfertigung .....	77
5.5 Lebenslauf .....	78
6. Danksagung .....	79



# **1. Einleitung**

## **1.1 Die Parkinson-Erkrankung**

### **1.1.1 Die Symptomatik der Parkinson-Erkrankung**

Die Parkinson-Erkrankung wurde im Jahr 1817 erstmals durch den Arzt James Parkinson beschrieben. Sie lässt sich grob in zwei Subtypen unterteilen. So existieren zum einen eine primäre Form, welche man auch als idiopathisches Parkinsonsyndrom (IPS) bezeichnen kann, und eine sekundäre bzw. symptomatische Form. Im Folgenden werden IPS und Morbus Parkinson, bzw. Parkinson-Erkrankung synonym verwendet.

Wie aus dem Namen bereits ersichtlich ist, herrscht bei der idiopathischen Parkinson-Erkrankung weitestgehend Unklarheit bezüglich der Ursache. Festzuhalten ist jedoch, dass das Alter einen Hauptrisikofaktor der Erkrankung darzustellen scheint. So liegt die Prävalenz bei einem Alter von unter 60 Jahren bei etwa 0,3% und steigt mit zunehmendem Alter auf 1-4% an. Ähnlich verhält es sich mit der jährlichen Neuerkrankungsrate. Vor dem 50. Lebensjahr treten kaum Fälle auf und die Inzidenz liegt bei 8 bis 18 Neuerkrankungen auf 100.000 Menschen. Wiederum kommt es hier mit zunehmendem Alter zum einem Anstieg und die Inzidenz steigt auf Spitzenwerte von etwa 700 neuen Fällen auf 100.000 Menschen bei einem Alter von über 80 Jahren. Es ist also damit zu rechnen, dass als Folge des demographischen Wandels die Anzahl der Parkinsonpatienten weiter zunehmen wird. Doch schon jetzt stellt das idiopathische Parkinsonsyndrom eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen beim Menschen dar (de Leau et al., 2006; Gerlach et al., 2003). Zu dem oben bereits erwähnten symptomatischen Subtyp zählen unter anderem medikamenteninduzierte; hier sind als Ursache vor allem die klassischen, dopaminantagonistischen Neuroleptika hervorzuheben, traumatisch bedingte, toxische, postencephalitische und durch Raumforderungen bedingte Formen (Gerlach et al., 2003). Die verschiedenen Subtypen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der klinischen Symptomatik kaum.

Die Hauptsymptome des Morbus Parkinson sind Rigor, Tremor, Brady- bis Akinese und posturale Instabilität. Hierbei ist ein asymmetrisches Auftreten der Symptome typisch, wobei hiervon nicht zwangsläufig alle auftreten müssen bzw. die einzelnen Komponenten durchaus unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. So kann beim idiopathischen Parkinsonsyndrom weiterhin grob zwischen einem Tremordominanz-Typ, der vor allem jüngere Patienten betrifft und durch ein im Vordergrund stehenden Tremor gekennzeichnet ist, einem akinetisch-rigidem Typ, bei welchem die Tremorkomponente nur gering ausgeprägt ist, und einem

Äquivalenztyp unterschieden werden (Obeso et al., 2010).

Bei der Brady- bzw. Akinese handelt es sich um eine Abnahme und Verlangsamung bzw. sogar dem Ausbleiben der Willkürbewegung, welche zudem mit einer Starthemmung einhergeht. Diese Abnahme beschränkt sich hierbei nicht nur auf die Extremitäten, sondern betrifft beispielsweise auch die Gesichtsmuskulatur und die Muskulatur, welche für die Sprachbildung von Bedeutung ist. Als Folge ist neben dem typischen kleinschrittigen Gangbild mit erhöhter Fallneigung auch eine Abnahme der Sprachbildung zu beobachten. So besteht bei vielen Parkinsonpatienten weiterhin ein gestörtes Kommunikationsvermögen (Mutch et al., 1986; Skodda, 2011).

Bei der Rigorkomponente handelt es sich um eine nicht-spastische Tonuserhöhung der Muskulatur, welche sich mittels des ebenfalls typischen Zahnradphänomens nachweisen lässt. Bei den Patienten äußert sich diese durch Muskelschmerzen und eine stark eingeschränkte Feinmotorik, welche in Form der Mikrographie beispielsweise das Schriftbild negativ beeinflusst.

Bei dem Tremor handelt es sich letztendlich um einen Ruhetremor, welchem die Erkrankung auch den von James Parkinson bereits verwendeten Namen „shaking palsy“ oder Schüttellähmung verdankt.

Die posturale Instabilität ist letztendlich die Unfähigkeit des Patienten eine Aufrechthaltung des Körpers zu gewährleisten, nachdem dieser durch einen, von extern einwirkenden, Bewegungsimpuls aus dem Gleichgewicht gebracht wurde.

Das idiopathische Parkinsonsyndrom ist allerdings nicht nur auf das zentrale Nervensystem bzw. rein auf die Motorik beschränkt. So zeigen sich für die Erkrankung typische Lewy-Körperchen, auf die ich weiter unten noch kurz eingehen möchte, nicht selten vor bzw. auch ohne eine motorische Symptomatik bereits im enterischen Nervensystem (Braak et al., 2004; Braak et al., 2008; Langston, 2006) und neben bzw. vor den motorischen Symptomen leiden die Patienten häufig auch unter Störungen des Geruchsempfindens, Obstipation, Kreislaufinstabilität aufgrund Untergangs vegetativer Innervation des Herzens, Schlafstörungen, Schmerzen und Depression (Langston, 2006; Obeso et al., 2010).

## 1.1.2 Überlegungen zur Ätiologie des Morbus Parkinson

Morbus Parkinson ist auf zellulärer Ebene charakterisiert durch den Untergang dopaminerger Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNc) und durch die Anwesenheit von Lewy-Körperchen in Neuronen der SNc und in anderen Bereichen des Nervensystems von Parkinsonpatienten (Ferrer et al., 2011; Takahashi und Wakabayashi, 2001). Wie oben bereits erwähnt, ist der genaue Mechanismus, welcher dem Untergang der dopaminerger Neurone zugrunde liegt nach wie vor unbekannt, sicher scheint nur zu sein, dass nicht ein einziger pathologischer Prozess, sondern vielmehr das Zusammenwirken verschiedener diesen bedingt und sich diese über Jahre hinziehen können. Von besonderer Bedeutung scheint hierbei zu sein, dass sich die Lewy-Körperchen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung keinesfalls stets gleichförmig verteilen. Vielmehr sind sie zu verschiedenen Zeitpunkten, d.h. Ausbildungsstufen des Morbus Parkinson an jeweils neuen Lokalisationen des patienteneigenen Nervensystems anzutreffen, z.T. lange bevor die parkinsontypischen Symptome auftreten. Anhand dieser Verteilungen lässt sich die Erkrankung in sechs verschiedene Stadien einteilen (Braak et al., 2004). Hervorzuheben ist hier, dass vor allem Neurone mit langen, schwach myelinisierten Axonen betroffen sind. So zeigte sich, dass die Lewy-Körperchen zunächst im dorsalen Motornucleus des N. vagus und in vorderen Anteilen des Bulbus olfactorius anzutreffen sind. Folgend werden dann die Formatio reticularis und die Raphekerne mit einbezogen, u.a. gefolgt von der SNc, womit die parkinsontypischen, motorischen Symptome auftreten. In den späten Stadien sind die Lewy-Körperchen dann zuletzt auch in Bereichen des Mesokortex und des Neokortex anzutreffen (Braak et al., 2004; Braak et al., 2006; Del Tredici et al., 2002; Dickson et al., 2010). Der Beginn der pathologischen Prozesse in Neuronen des N. vagus, die lange, zum enterischen Nervensystem weisende Verbindungen besitzen und im Bereich des Bulbus olfactorius, sowie das frühe Fehlen von Lewy-Körperchen an anderen Orten, gaben Anstoß zur „Dual Hit“-Theorie. Hiernach besteht die Möglichkeit, dass eine bisher unbekannte toxische Substanz entweder direkt über den Darm, direkt über die Nasenschleimhaut oder indirekt über die Verbindung der Nase zur Mundhöhle und damit zum Verdauungstrakt aufgenommen werden könnte, dort in die entsprechenden enterischen Neurone aufgenommen werde und dann folgend die oben erwähnten Strukturen in Mitleidenschaft ziehen könnte. Der aufsteigende Charakter der Parkinsonerkrankung wird durch die Beobachtung gestützt, dass Parkinsonpatienten lange vor dem motorischen Störungsbild u.a. an Riechstörungen und gastrointestinalen Problemen wie Verstopfung leiden. Auch der Befall besonders gering myelinisierter, d.h. nach außen schlecht

geschützter Neurone könnte für eine von außen auf die Zellen wirkende Noxe sprechen (Hawkes et al., 2007; Hawkes et al., 2009).

Wie bereits erwähnt kann dies jedoch, wenn überhaupt, nur einen Teilbaustein zur Entstehung des Morbus Parkinson ausmachen. Auch könnte der besonderen Stoffwechselsituation des zentralen Nervensystems eine besondere Rolle zukommen. So macht dieses zwar nur einen Bruchteil der Gesamtmasse des menschlichen Organismus aus, verbraucht allerdings jedoch mehr als 20% des gesamten Sauerstoffs (Halliwell, 2006). Der Grund für diesen enormen Verbrauch ist der hohe ATP-Bedarf um ein perfektes Ionen-Gleichgewicht zu bewahren, welches unerlässlich für die neuronale Erregung und Signalweiterleitung ist. ATP wird durch die Mitochondrien produziert, ein Prozess bei welchem physiologisch bereits geringe Mengen an Radikalen anfallen (Turrens, 2003). Auch beim Stoffwechsel der Neurotransmitter, v.a. der Katecholamine wie beispielsweise Dopamin, können Radikale entstehen (Spencer et al., 1998). Des Weiteren spielt Eisen eine wichtige Rolle bei der Bildung von Radikalen (Gutteridge, 1992) und es wurde in Studien gezeigt, dass sich in der SNc von Parkinsonpatienten erhöhte Eisenspiegel auffinden lassen (Olanow und Tatton, 1999). Die gebildeten Radikale sind in der Lage die jeweilige Zelle zu schädigen. Entweder durch direkte Reaktionen mit der DNA, durch Reaktion mit Proteinen oder aber durch Interaktion mit Membranlipiden (Alvarez und Radi, 2003). Es existieren zum Schutze der Zellen Systeme, um diese Schäden zu verhindern, d.h. die Radikale unschädlich zu machen. Von besonderer Bedeutung ist hier die Glutathion-Peroxidase, durch welche mittels Oxidation von Glutathion reaktives Wasserstoffperoxid abgebaut wird (Brigelius-Flohé, 1999). Es zeigt sich, dass auch der Glutathion-Spiegel bei Parkinsonpatienten erniedrigt ist (Sofic et al., 1992). Somit könnte der Untergang der dopaminergen Neurone auch durch nicht mehr kompensierten, bzw. erhöhten oxidativen Stress bedingt sein.

Auch rücken in letzter Zeit die oben erwähnten Lewy-Körperchen bzw. einer ihrer Bestandteile, das  $\alpha$ -Synuclein, welches alle Lewy-Körperchen aufweisen (Goedert et al., 1998), in das Zentrum der Aufmerksamkeit. Alpha-Synuclein ist ein präsynaptisches Protein, dessen physiologische Funktion bisher noch nicht geklärt ist (Burré et al., 2010). Es scheint jedoch eine Rolle bei der Interaktion mit Biomembranen zu spielen und weist hierbei eine  $\alpha$ -helikale Struktur auf, wenn es an Lipidmembranen gebunden ist. Bei höheren Konzentrationen oder bei Anwesenheit von mutierten Formen, wie sie in einigen Familien mit genetisch bedingtem Morbus Parkinson vorliegen (Polymeropoulos et al., 1997), weist es einen erhöhten Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen auf und neigt zur Ausbildung von Aggregaten, (Angot und Brundin, 2009; Conway et al., 1998; Ferreón et al., 2009). Diese fehlgefalteten

Aggregate sind nicht mehr membrangebunden und nur schlecht durch die zellulären Proteasomen abbaubar, sondern hemmen gar deren Funktion. Dies führt zu einem weiteren, zur Aggregatbildung neigenden, Anstieg der Konzentration des  $\alpha$ -Synuclein (McNaught et al., 2003; Snyder et al., 2003). Diese ansteigende Konzentration scheint wiederum in der Lage zu sein, den Untergang der dopaminergen Neurone zu induzieren (Eslamboli et al., 2007). Der Untergang betroffener Neurone setzt dann unter anderem fehlgefaltetes  $\alpha$ -Synuclein frei, ein Prozess, der auch ohne Untergang, d.h. durch noch vitale Neurone via Exozytose durchgeführt werden kann. Hierbei legt das Fehlen von, für die Exozytose eigentlich notwendigen, Signalsequenzen nahe, dass ein unkonventioneller Weg der Exozytose eingeschlagen wird. Dieser Weg scheint auch nicht durch die zellulären Inhibitoren der „klassischen“ Exozytose unterbrechbar. Das freigesetzte  $\alpha$ -Synuclein ist folgend dazu in der Lage, entweder relativ schnell passiv über die Zellmembran anderer Neurone oder etwas langsamer über einen noch unbekanntem Rezeptor endozytotisch in benachbarte Neurone aufgenommen zu werden. Auch hierbei scheinen die zellulären Inhibitoren wirkungslos. Dort angelangt löst es eine Fehlfaltung des noch nativen  $\alpha$ -Synucleins aus. Damit könnte die Parkinsonerkrankung den Charakter einer Prionenerkrankung aufweisen (Angot und Brundin, 2009). Unterstützt wird diese These durch Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Kordower et al. (2008) und Li et al. (2008), die zeigten, dass auch embryonale Stammzellen, welche in das Putamen von Parkinsonpatienten transplantiert wurden und frei von jeglichen pathologischen Strukturen waren, nach Jahren im erkrankten Empfängerhirn Lewy-Körperchen aufweisen.

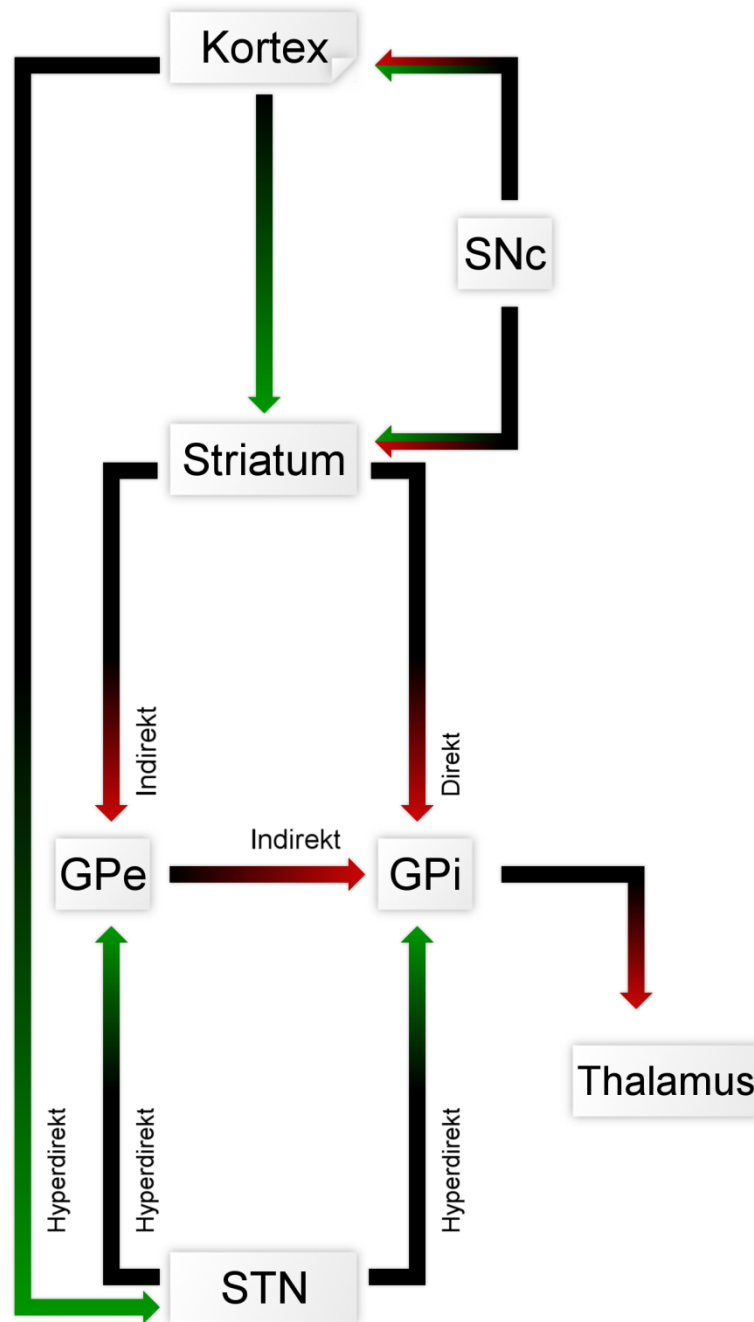
## **1.2 Die Parkinsonerkrankung und die Basalganglien**

### **1.2.1 Die Basalganglien und ihre Vernetzung**

Die Basalganglien gehören zu den subkortikalen Kernen des zentralen Nervensystems. Sie nehmen eine Schlüsselrolle bei der Ausführung von Bewegung ein, bzw. modulieren den von den motorischen und assoziativen Kortexarealen stammenden Impuls um diese auszulösen. Ferner sind sie jedoch ebenfalls von Bedeutung bei Abläufen wie Aufmerksamkeit, Gewohnheitsbildung, Lernprozessen und der Ausbildung von Zeitgefühl (Obeso et al., 2008a) und stehen in diesem Zusammenhang über den Nucleus accumbens in engem Kontakt zum

limbischen System. Letzteres ist entscheidend für flexibles und ggf. abgeändertes Verhalten in verschiedenen Situationen (Grace et al., 2008). Da beim Morbus Parkinson jedoch vor allem die motorische Komponente im Vordergrund steht, möchte ich im Folgenden hauptsächlich auf die Funktion der Basalganglien im Rahmen der Motorik eingehen. Zu den Basalganglien zählen das Striatum (CPu) und das Pallidum. Ersteres setzt sich zusammen aus dem Nucleus caudatus und dem Putamen. Der Name rührt vom streifigen Erscheinungsbild, welches durch die entwicklungsbedingte, unvollständige Auseinandertreibung beider Regionen durch Fasern der Capsula interna bedingt ist, her. Das Pallidum gliedert sich wiederum in eine Pars externa (GPe) und eine Pars interna (GPi). Zu den Basalganglien können weiterhin, aus funktionellen Gesichtspunkten, auch der Nucleus subthalamicus (STN) und die Substantia nigra, welche unterteilt ist in eine Pars compacta (SNc) und eine Pars reticulata (SNr), gezählt werden. Die Substantia nigra verdankt ihren Namen der schwärzlichen Färbung, welche durch Neuromelanin bedingt ist. Dieses wiederum ist enzymatisch durch die Tyrosinhydroxylase (TH) erzeugt bzw. autooxidativ entstehendes Derivat des Dopamins (DA) (Zecca et al., 2001).

Das Striatum besteht zu etwas 95% aus GABAergen Projektionsneuronen (Pisani et al., 2007), welche afferent jeweils in einem Verhältnis von 1000:1 mit kortikalen glutamatergen Neuronen verbunden sind (Obeso et al., 2008a). Weitere afferente Verbindungen des Striatums bestehen zudem mit dem Thalamus, hier vor allem dem intralaminären Anteil, und den Raphekernen (Marsden, 1982). Auch finden sich hier von der SNc ausgehende dopaminerge Afferenzen, die jeweils ca. 1.000.000 Verbindungen mit spezifischen Neuronen des Striatums bilden und sowohl cholinerge als auch GABAerge Interneurone erreichen (Grace et al., 2008). Efferent ist das Striatum direkt und indirekt über den GPe mit dem GPi verbunden. Diese beiden Kerngebiete empfangen des Weiteren glutamaterge Afferenzen vom STN und projizieren GABAerg auf den Thalamus, genauer die ventral-anterioren, ventral-lateralen und medio-dorsalen Nuclei des Thalamus, welche wiederum glutamaterg in Verbindung mit motorischen und präfrontalen Kortexarealen stehen (Albin et al., 1989). Der STN wird seinerseits afferent durch glutamaterge Fasern des Kortex innerviert. Die Vernetzung all dieser Strukturen wird schematisch in **Abbildung 1** dargestellt.



**Abbildung 1:** Schema zur Vernetzung der Basalganglien. Exzitatorische Verknüpfungen sind mittels eines grünen Pfeiles gekennzeichnet, inhibitorische mittels eines roten Pfeiles. Die Pfeilspitzen weisen in Richtung der Projektion. SNc = Substantia nigra pars compacta, GPe = Globus Pallidus pars externa, GPi = Globus pallidus pars interna, STN = Nucleus subthalamicus.

### 1.2.2 Der Pfad der Bewegung

Soll eine Bewegung ausgeführt werden, so geht von den motorischen, sensorischen und assoziativen Kortexarealen über die zahlreichen Neurone ein Impuls an das Striatum, der die dortigen Neurone mit dem Neurotransmitter Glutamat, unter Verwendung von NMDA- und

AMPA-Rezeptoren (Surmeier et al., 2007), erregt. Im Striatum kann das Signal auf zwei Hauptwegen weiter verarbeitet werden. So besteht über die GABAerge Projektionsneurone eine „direkte“ Verbindung zur Ausgangsstation der Basalganglien, dem GPi, oder aber „indirekt“ über den GPe zum GPi. Hierbei entstammen die Fasern, welche auf dem „direkten“ Weg wirken der neokortikalen Lamina III und die Fasern des „indirekten“ Weges der Lamina V (Obeso et al., 2008a). Der GPe erhält ebenfalls GABAerge Afferenzen. Um jedoch das enorme Eingangssignal der afferenten Kortexareale zu modulieren, d.h. Motorik in einem adäquaten Ausmaß auszuführen, wirken weitere Afferenzen auf die striatalen Neurone. So wird zur Ausführung von Bewegung auch die Substantia nigra durch kortikale Afferenzen aktiviert und entsendet dopaminerge Efferenzen in das Striatum. Neben der Herkunft der auf sie projizierenden Neurone unterscheiden sich die striatalen Neurone des „direkten“ und „indirekten“ Weges nun auch bezüglich des Typs des exprimierten Dopaminrezeptors. So weisen Neurone des ersteren Weges D1- und Neurone des letzteren Weges D2-Rezeptoren auf (Obeso et al., 2008a). Diese beiden Rezeptoren verhalten sich unterschiedlich bezüglich ihrer Wirkung auf die sie tragenden Neurone. So erhöht Dopamin über die D1-Rezeptoren die Dichte der NMDA- und AMPA-Rezeptoren, aktiviert Calciumkanäle und erhöht so die Erregbarkeit der CPu-Neurone durch kortikale Afferenzen. D2-Rezeptoren führen bei ihrer Aktivierung hingegen zur Herunterregulierung von Glutamatrezeptoren, inaktivieren Natriumkanäle und senken so letztendlich auch die Erregbarkeit der Neurone gegenüber Dopamin (Surmeier et al., 2007). Auf dem „direkten“ Weg wird der GPi somit vermehrt gehemmt und der Thalamus enthemmt. Auf dem „indirekten“ Weg wird unter Mitwirkung von Dopamin der GPe weniger gehemmt, der GPi daraufhin gehemmt und der Thalamus wiederum enthemmt. Auch die zum Striatum ziehenden kortikalen Afferenzen unterliegen einer sehr ähnlichen Modulation. So sorgt Dopamin bei den Neuronen der Lamina III für eine erhöhte, und bei den Neuronen der Lamina V für eine reduzierte Ausschüttung von Glutamat (Obeso et al., 2008b).

Neben dieser dopaminergen Modulation bestehen darüber hinaus noch striatale, GABAerge und cholinerge Interneurone, die die verbleibenden Neurone des Striatums ausmachen (Pisani et al., 2007). Auch diese empfangen kortikale Afferenzen und werden über D2-rezeptoren dopaminerg moduliert (Surmeier et al., 2007). Bei den GABAergen Interneuronen existieren verschiedene Subtypen (Kawaguchi et al., 1995), aufgrund der durch sie generierten IPSPs haben sie jedoch alle v.a. einen inhibitorischen Einfluss auf die striatalen Projektionsneurone (Tepper et al., 2004). Die cholinergen Interneurone wirken im Striatum v.a. über M1- und M4-Acetylcholinrezeptoren (Pisani et al., 2007).



Parallel zum „direkten“ und „indirekten“ Weg besteht auch noch ein schnellerer, „hyperdirekter“ Weg über welchen der Impuls für eine Bewegung übermittelt wird und zwar die disynaptische Verbindung des Kortex mit dem GPe und GPi über den STN. Ein Impuls für die Motorik erreicht also den STN und aktiviert GPi-Neurone, welche im Thalamus sowohl die gewünschte als auch potentiell unerwünschte Bewegungen unterdrücken. Aus dem Striatum folgt nun das modulierte und über den „direkten“ Weg geschickte Signal, welches über den GPi für eine Disinhibition der gewünschten Bewegung sorgt. Letztendlich folgt das Signal des „indirekten“ Weges, welches v.a. für eine Blockade unerwünschter Bewegungen sorgt (Graybiel, 2000; Nambu, 2005; Obeso et al., 2008b).

### **1.2.3 Dysfunktion der Basalganglien im Rahmen des Morbus Parkinson**

Der beim Morbus Parkinson auftretende fortschreitende Rückgang der dopaminergen Projektion auf das Striatum, d.h. die absolute Abnahme des im Striatum vorliegenden Dopamins haben weitreichende Folgen für die Funktionalität der Basalganglien. So fehlen zum einen die negative Modulation des „indirekten“ Weges, welche zu einer verminderten Aktivität des GPe führt und zum anderen die positive, d.h. exzitatorische Beeinflussung des „direkten“ Weges. Es existieren Hinweise, dass es sich auch entsprechend mit den kortikostriatalen Bahnen verhält (Mallet et al., 2006), bzw. es generell zu einem Rückgang der kortikalen Afferenzen kommt. Letzteres ist zurückzuführen auf den Wegfall der durch D2-Rezeptor und Interneurone vermittelten Impulsreduktion, auf welche das Nervensystem, zur versuchten Wiederherstellung des Normalzustandes, reagiert. Bei den Interneuronen handelt es sich v.a. um die cholinergen Interneurone, welche aufgrund des Dopaminmangels eine gesteigerte Aktivität aufweisen. So entsteht eine weitere Verstärkung des kortikalen Inputs und damit Vergrößerung des fehlregulierten Zustandes (Surmeier et al., 2007). Auch der STN wird aufgrund seiner Verbindungen zum GPe und GPi in diesen Zustand einbezogen. Ist er anfangs aufgrund seiner reziproken Verbindungen noch in der Lage die Unteraktivität des GPe, d.h. die eigene Disinhibition auszugleichen, versagt diese Fähigkeit mit dem Fortschreiten der Erkrankung. Dies führt zu einer gesteigerten Aktivität des STN und somit zu einer weiter erschwerten Bewegungsbildung (Obeso et al., 2008b).

Summierend resultieren demzufolge eine verminderte Aktivität des „direkten“ Weges und eine relative Überaktivität des „indirekten“ Weges (Nambu, 2005) in Kombination mit verringertem kortikalem Input. All dies kann für die Unfähigkeit der Parkinsonpatienten

verantwortlich gemacht werden, bewusst adäquate bzw. überhaupt Bewegungen auszuführen (Nambu, 2005; Surmeier et al., 2007). Die oben erwähnte Verbindung zum limbischen System könnte ihrerseits für die, bei Parkinsonpatienten beobachteten, kognitiven Veränderungen verantwortlich sein (Grace, 2008).

### **1.3 Therapieoptionen der Parkinsonerkrankung**

Da eine eindeutige Ursache für den Untergang der striatalen dopaminergen Neurone noch nicht gefunden wurde, beschränken sich die Therapiemöglichkeiten des Morbus Parkinson auf die symptomatische Behandlung der vorliegenden Beschwerden. Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten. So ist es möglich, Dopamin bzw. dessen Vorstufe zu verabreichen, den vorliegenden Dopaminmangel mit Rezeptoragonisten zu behandeln, den Abbau des noch vorhandenen Dopamins zu verzögern, durch operative Eingriffe zu versuchen die Beschwerden zu mindern, durch direkt platzierte Elektroden das Striatum, das Pallidum oder den Nucleus subthalamicus zu stimulieren oder aber den relativen Hypercholinismus mittels Rezeptorantagonisten bzw. Verminderung der Acetylcholinfreisetzung auszubremsen.

#### **1.3.1 Verwendung der Dopaminvorstufe L-DOPA**

Da beim Morbus Parkinson ein striataler Dopaminmangel vorliegt, scheint die Verabreichung von Dopamin ein logischer Schluss. Da Dopamin als solches jedoch nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wird stattdessen die Vorstufe L-Dopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) verwendet. Dieses wird durch die DOPA-Decarboxylase der verbliebenen Neurone der SNc und von Gliazellen zu Dopamin decarboxyliert. Dieses Dopamin steht dann den noch vorhandenen striatalen Neuronen zur Verfügung und führt so zu einer erheblichen Verbesserung der motorischen Beschwerden (Calne und Sandler, 1970; Müller, 2012). Da jedoch auch außerhalb des zentralen Nervensystems L-DOPA durch peripher befindliche DOPA-Decarboxylasen umgewandelt wird, muss, bei alleiniger Gabe von L-DOPA, dieses sehr hoch dosiert werden. Zudem sorgt das peripher anfallende Dopamin für eine Reihe von Nebenwirkungen wie beispielsweise Übelkeit und Erbrechen (Clark, 2002). Eine zusätzlich Gabe von nicht Blut-Hirn-Schranken gängigen Decarboxylaseinhibitoren wie Benserazid oder Carbidopa minimiert die periphere Umwandlung in Dopamin und sorgt so für deutlich geringere Nebenwirkungen und senkt die

zu gebende L-DOPA Menge um das drei- bis vierfache. Noch stärker lässt sich die verabreichende Menge durch die Gabe eines Hemmstoffs der Catechol-O-Methyltransferase senken. Dieses Enzym ist am Abbau des L-DOPA beteiligt (Müller, 2012). In der Anfangsphase ist L-DOPA sehr gut verträglich und sorgt für eine fast vollständige Abwesenheit der Beschwerden. Man spricht in diesem Zusammenhang von der „Honeymoon-Phase“, welche über Jahre andauern kann. Darauf folgt jedoch die Entwicklung von motorischen Anomalien wie Dyskinesien, Dystonien, einer nach der Einnahme von L-DOPA immer kürzeren Wirkdauer (sog. „wearing off effect“) und ein unvorhersehbarer Wechsel zwischen Phasen mit erhöhter Mobilität und Phasen mit dem gegenteiligen Effekt (sog. On/Off-Fluktuationen). Diese Anomalien nehmen mit Dauer der L-DOPA Behandlung zu und haben letztendlich dafür gesorgt, dass L-DOPA hauptsächlich bei schweren Stadien der Erkrankung oder bei sehr alten Patienten eingesetzt wird (Clark, 2002). Verantwortlich für diese Anomalien wird im Falle der abnehmenden Wirkung die abnehmende Anzahl der dopaminergen Neurone gemacht, die die Einsatzmöglichkeit von L-DOPA begrenzt. Auch wird diskutiert, dass der dauerhafte Einsatz von L-DOPA durch tonische und unphysiologisch pulsatile Bereitstellung von Dopamin, das Aktivierungsniveau der Basalganglien zu Gunsten der weiteren motorischen Anomalien verändert wird (Grace, 2008). Weiterhin steht aufgrund unterschiedlicher, zum Teil widersprüchlicher Studien die Frage im Raum, ob bei der dauerhaften Therapie mit L-DOPA dieses ein etwaiges neurotoxisches Potential aufweist, was die ohnehin schon ablaufende Degeneration der striatalen Neurone weiter verschlimmern würde (Müller, 2012). So kann alles in allem gesagt werden, dass die Therapie mit L-DOPA derzeit zwar die beste Möglichkeit der Behandlung der parkinsontypischen, motorischen Beschwerden darstellt, sie ist jedoch bei den bestehenden Bedenken keinesfalls die optimalste Option.

### **1.3.2 Verwendung von Dopaminrezeptoragonisten**

Dopaminrezeptoragonisten (DAA) sind Substanzen, welche ohne vorherige Umwandlung und unabhängig von den dopaminergen Neuronen des Striatums direkt an postsynaptischen Dopaminrezeptoren wirken (Müller, 2012). Die Wirkung entspricht etwa dem des L-DOPA, auch wenn die Agonisten bei Weitem nicht so effektiv sind. Im Verlauf der Parkinsonerkrankung muss aus diesem Grund nach etwa 2 bis 5 Jahren auf L-DOPA zurückgegriffen werden, um ein zufriedenstellendes Ausmaß der Minderung der Beschwerden

zu gewährleisten (Antonini et al., 2009). Auch treten bei der Therapie mit Dopaminrezeptoragonisten häufig Nebenwirkungen wie Schwindel, Übelkeit und Erbrechen auf, sodass nur ein langsames Herantasten an die optimale therapeutische Dosis möglich ist (Müller, 2012). Ferner besteht bei manchen Agonisten ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von Herzklappen- oder Lungenfibrosen (Tintner et al., 2005) und ein Risiko für Entzugserscheinungen beim Absetzen der Medikation wie Schmerzen, Angstzustände, erhöhtes Suchtverhalten und anderen Verhaltensauffälligkeiten bei einem Teil der mit ihnen behandelten Patienten (Rabinak und Nirenberg, 2010).

### **1.3.3 Verwendung von Monoaminoxidasehemmern**

Dopamin wird durch die Monoaminoxidase B (MAO-B) abgebaut. Die selektive Hemmung dieses Enzyms erhöht die im synaptischen Spalt der striatalen Neurone zur Verfügung stehende Menge an Dopamin. Bei der Gabe höherer Dosen geht jedoch die Selektivität verloren, sodass auch die Monoaminoxidase A gehemmt werden kann und so v.a. Blutdruckstörungen auftreten können (Müller, 2012).

### **1.3.4 Therapie mittels operativer Eingriffe**

Bei der traditionellen, d.h. vor Aufkommen der Therapie mit L-DOPA, ablativen Therapie unterscheidet man je nach Zielgebiet v.a. die Pallidotomie und die Thalamotomie. Diese Eingriffe wurden v.a. in den 1940er bis 1950er Jahren durchgeführt und gerieten mit dem Aufkommen der L-DOPA-Therapie auch aufgrund der Operationsrisiken in den Hintergrund. Die oben beschriebenen Nebenwirkungen und die Etablierung neuer stereotaktischer Operationsverfahren und die damit verbundenen reduzierten Risiken, sorgten in den 1980er Jahren jedoch erneut für wachsendes Interesse an den operativen Therapieoptionen (Chao et al., 2007). Die Pallidotomie zielt v.a. darauf ab den überaktiven GPi zu schädigen und so dessen Aktivität zu vermindern. Die reduzierte Aktivität führt hauptsächlich zu einer Verbesserung der Akinese und Rigidität der Patienten (Lozano et al., 1995). Postoperativ kann es jedoch bei bestehender Demenz zu einer Verschlechterung von dieser und zu einem Auftreten von Depressionen oder Persönlichkeitsveränderungen kommen (Lang et al., 1997). Die Thalamotomie ist sehr effektiv bei der Therapie des Tremors. Sie zeigt jedoch keinen nennenswerten Erfolg bei der Behandlung der anderen motorischen Beschwerden der

Parkinsonerkrankung. Auch kann eine in diesem Kontext durchgeführte Thalamotomie zu Sprach- oder kognitiven Störungen führen (Chao et al., 2007).

### **1.3.5 Anwendung der tiefen Hirnstimulation**

Die tiefe Hirnstimulation (deep brain stimulation, DBS) ist ein spezielles, neueres operatives Verfahren zur Therapie des Morbus Parkinson. Anders als bei den ablativen Operationsverfahren wird hierbei nicht die direkte Schädigung der überaktiven Regionen der Basalganglien zur Therapie eingesetzt. Vielmehr bedient man sich bei der DBS kleiner Elektroden, die in die Zielstrukturen, hier v.a. der Nucleus subthalamicus, stereotaktisch eingebracht werden. Strompulse, die über einen externen Generator erzeugt werden, können über diese nun die Aktivität der entsprechenden Regionen mindern. Die DBS ist mit weitaus weniger Nebenwirkungen verbunden als die ablativen Verfahren und minimiert die invasiven Schäden am Hirngewebe. Darüber hinaus ist der applizierte Strom fein steuerbar und so eine individuelle Anpassung möglich (Montgomery, 1999). Diese Therapiemöglichkeit verbessert die Parkinsonbeschwerden effektiv und ist bei einem selektioniertem Patientenkollektiv der reinen medikamentösen Therapie überlegen (Weaver et al., 2009). Dennoch bestehen auch hier operationsbedingte Nebenwirkungen, die beispielsweise in Form von subkortikalen Blutungen, Lungenembolien oder Infarkten tödlich ausgehen können (Umemura et al., 2003).

### **1.3.6 Verwendung von Anticholinergika**

Anticholinerge Substanzen sind Antagonisten an den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren im Striatum. Der Angriffspunkt der anticholinergen Therapie ist die oben erwähnte Überaktivität der cholinergen Interneurone mit dem Versuch das vorliegende Ungleichgewicht zu beseitigen. Sie stellt eine der ersten medikamentösen Behandlungsweisen des Morbus Parkinson dar. So zeigte sich ursprünglich, dass Atropin im Tierversuch die parkinsontypische Bewegungsarmut reduzieren kann. Aktuell werden Anticholinergika in Kombination mit L-DOPA zur Minderung der Bewegungsarmut oder aber selbständig, um die Anwendung von L-DOPA aufgrund der oben beschriebenen Probleme zu verzögern, systemisch eingesetzt. Des Weiteren besitzen anticholinerge Medikamente die Fähigkeit, die Tremorkomponente der Parkinsonerkrankung effektiv abzuschwächen (Brocks, 1999). Ein Problem der systemischen Gabe stellt jedoch das relativ große Spektrum an Nebenwirkungen

dar. So kommt es unter Anwendung von Anticholinergika u.a. zu Mundtrockenheit, Störungen im Verdauungstrakt wie beispielsweise Obstipation und Schluckstörungen, Harnverhalt, Tachykardien, Sehstörungen, Schwindel, Übelkeit und kognitiven Störungen (Clarke, 2002). Auch haben sie einen negativen Einfluss auf andere Teilaspekte des Morbus Parkinson. So kommt es durch Hemmung anderer cholinergischer Hirnstrukturen zu Koordinationsproblemen, welche das Beschwerdebild der Erkrankung verstärken (Bohnen und Albin, 2011). Eine lediglich lokal wirksame anticholinerge Therapie könnte hier erhebliche Verbesserungen mit sich führen. So bestehen zurzeit Unternehmungen, dass anticholinerg wirkende Botulinum Neurotoxin A (BoNT-A) lokal im Striatum beim Parkinsonmodell der Ratte zu applizieren (Wree et al., 2011).

## **1.4 Botulinum Neurotoxine**

### **1.4.1 Funktionsweise von Botulinum Neurotoxinen**

Botulinum Neurotoxine (BoNT) sind der Verursacher des Botulismus, einer v.a. durch verdorbene Lebensmittel hervorgerufenen, heute relativ seltenen Intoxikation. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten einer, zuerst an den unteren Extremitäten beginnenden, Muskelschwäche, einer generellen Mattig- bzw. Müdigkeit, gastrointestinalen Beschwerden, Störungen des visuellen Systems, Schwindel, Hypotonie und einer gestörten Speichelproduktion. Die Muskelschwäche, allem voran das Versagen der Atemmuskulatur, ist die häufigste Ursache eines tödlichen Ausgangs der Vergiftung mit BoNT. Trotz des breiten Beschwerdebildes kommt es jedoch beim Überleben der Intoxikation zu einer Rückbildung der Erkrankung ohne weitere Folgeschäden (Critchley, 1991; Dickson, 1918). Die verantwortlichen BoNT sind die giftigsten bekannten, natürlichen Substanzen (Gill, 1982). Sie werden durch grampositive und obligat anaerobe Clostridien gebildet, genauer durch *Clostridium botulinum*, *barati*, *butyricum* und *argentinae* (Chaddock und Marks, 2006; Schiavo et al., 2000). Entsprechend ihrer Reaktion mit verschiedenen Antisera lassen sich die BoNT in acht Subklassen unterteilen, die da wären BoNT-A, -B, -C<sub>1</sub>, -C<sub>2</sub>, -D, -E, -F und BoNT-G. Sie werden durch die Bakterien alle als Vorstufe synthetisiert, welche posttranslational am N-terminalen Ende in zwei unterschiedlich große Fragmente gespalten wird, die durch eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Diese Fragmente sind zum einen eine

N-terminale leichte Kette (light chain, LC) mit einer Molekülmasse von etwa 50 kDa und zum anderen die C-terminale schwere Kette (heavy chain, HC) mit einer Masse von ungefähr 100 kDa. Zusammen mit nicht-toxischen Hämagglutininen und anderen Proteinen, die das Toxin als Komplex u.a. bei oraler Aufnahme vor dem sauren Milieu des Magens schützen und sich erst aufgrund des alkalischen Milieus im Dünndarm vom Toxin lösen, werden sie durch Autolyse der Bakterien freigesetzt (Oguma et al., 1995; Schiavo et al., 2000). Die LC ist bei allen BoNT strukturell grundsätzlich ähnlich und fungiert als Zink-Endoprotease, welche jeweils unterschiedliche Bestandteile des SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)- Komplexes an je einer Peptidbindung spalten. Der SNARE-Komplex besteht beim Menschen u.a. aus den Proteinen Synaptobrevin 2 (Vesikel assoziiertes Membranprotein-2, VAMP-2), Syntaxin und SNAP-25 (Synaptosom-assoziiertes Protein-25 kDa), welche jeweils Substrate für die LC der verschiedenen BoNT sind. Hierbei sind die jeweiligen Substrate spezifisch für bestimmte einzelne BoNT. So spalten BoNT-A, -C und -E das Protein SNAP-25, BoNT-B, -D, -E und -G Synaptobrevin und BoNT-C als einziges zusätzlich noch Syntaxin. Da ein intakter SNARE-Komplex essentiell für die Vesikelfusion d.h. für die Exozytose bzw. Transmitterexozytose ist und BoNT relativ spezifisch an Motoneurone binden, blockieren diese Toxine die Aktivität dieser cholinergen Neurone und bedingen so die oben erwähnte Muskelschwäche und die weiteren assoziierten Beschwerden. Die spezifische Bindung wird durch die HC ermöglicht, ohne welche die LC nicht zu ihrer Zielstruktur gelangen würde. Auch ist die LC durch Bindung an die HC inaktiv, d.h. ihr katalytisches Zentrum liegt nicht frei, und wird erst nach Trennung beider Kette aktiviert. Die HC ist wiederum in zwei Unterdomänen geteilt: eine N-terminale ( $HC_N$ ) und eine C-terminale ( $HC_C$ ). Hierbei vermittelt die  $HC_C$  die Bindung an die Zielstrukturen. So werden bei allen BoNT zum einen Ganglioside gebunden, welche Bestandteil der präsynaptischen Zielmembran sind, und zum anderen wird über diese Domäne eine für die verschiedenen BoNT spezifische Bindung an bestimmte Rezeptoren ermöglicht (Breidenbach und Brunger, 2004; Chaddock und Marks, 2006; Schiavo et al., 2000; Verderio et al., 2006). Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Proteine der Vesikelmembranen. Dies bedingt, dass im Sinne der Transmitterexozytose besonders aktive Neurone besonders viele Rezeptoren exprimieren und so für die BoNT besonders angreifbar sind. Hierbei binden BoNT-A, -D, -E und -F an das synaptische Vesikelprotein 2 (SV2), BoNT-B und -G demgegenüber an Synaptotagmin I und II (Dong et al., 2006, 2008; Fu et al., 2009; Mahrhold et al., 2006; Nishiki et al., 2006; Peng et al., 2011; Rummel et al., 2004, 2009). Nach der Bindung an den entsprechenden Rezeptor folgt die Endozytose. Dieser Vorgang wird von den BoNT genutzt um in die Zelle zu

gelangen. Im Inneren der Zelle werden die Vesikel zur erneuten Aufnahme von Neurotransmittermolekülen angesäuert. Der niedrige pH-Wert ermöglicht es den BoNT, aufgrund von sich mit Protonierung veränderten Ladungsverhältnissen, mit der Membran zu interagieren. Hierbei wird das N-terminale Ende der HC in die hydrophobe Ebene der Membran verlagert und bildet eine Pore durch welche die LC aus dem synaptischen Vesikel in das Cytosol der betroffenen Zelle gelangen kann. Während dieser Passage wird es kurzzeitig entfaltet und die Disulfidbrücke, welche die LC und die HC verbindet, durch Reduktion getrennt. Diese Trennung legt, wie oben bereits angedeutet, das katalytische Zentrum der LC frei und ermöglicht so nach erneutem Falten der LC die Spaltung des SNARE-Komplexes (Rossetto et al., 2013; Schiavo et al., 2000).

Da BoNT im Vergiftungsfall nicht die Blut-Hirn Schranke überwinden können, bleibt deren Wirkung in diesem Zusammenhang auf das periphere Nervensystem beschränkt. Dennoch lassen sie sich durch direkte Injektion auch zentral applizieren und zeigen auch im zentralen Nervensystem eine anticholinerge Wirkung (Luvisetto et al., 2003; Verderio et al., 2006). Auch beschränkt sich die Wirkung der BoNT nicht alleine auf das cholinerge System. Besonders in steigenden Konzentrationen vermindern sie ebenfalls die Freisetzung anderer Neurotransmitter (Bigalke et al., 1981, 1985).

## **1.4.2 BoNT als Therapieoption verschiedenster Erkrankungen**

### **1.4.2.1 Therapie der Dystonie**

Dystonien sind gekennzeichnet durch unfreiwillige, unregelmäßige oder anhaltende überschießende Kontraktionen von Muskeln normaler Bewegungsabläufe und z. T. von Muskeln, die diese antagonisieren. Dies führt u.a. zu abnormen, verdrehten Haltungen oder steifen, verlangsamten Bewegungen, die z.T. mit erheblichen funktionellen Einschränkungen und Schmerzen einhergehen können. Je nach beteiligten Muskeln variiert das Erscheinungsbild der Erkrankung und je nach Anzahl der beteiligten Muskeln und deren regionalen Nähe unterscheidet man fokale, segmentale, multifokale und generalisierte Dystonien. Hierbei betreffen die fokalen Dystonien eine bestimmte Körperregion, am häufigsten Muskeln der Halsregion, segmentale Dystonien umfassen zwei oder mehrere zusammenhängende Körperregionen, multifokale Dystonien betreffen zwei oder mehrere nicht zusammenhängende Körperregionen und generalisierte Dystonien schließen zuletzt



großflächige Regionen ein (Neychev et al., 2011; Standaert, 2011).

Als Ursachen für Dystonien werden Störungen der Basalganglien, Schäden am Hirnstamm oder am Kleinhirn bzw. Schäden an zum Kleinhirn führenden Afferenzen, Stoffwechselerkrankungen oder genetische Fehler verschiedenster Proteine, u.a. auch von Proteinen, die direkt am Dopaminstoffwechsel beteiligt sind, diskutiert (Neychev et al., 2011; Standaert, 2011).

Ähnlich wie beim Morbus Parkinson beschränken sich, außer bei ursächlichen Stoffwechselerkrankungen wie beispielsweise Morbus Wilson, die therapeutischen Maßnahmen auf symptomatische Interventionen. So wurden in diesem Zusammenhang orale Anticholinergika eingesetzt, die eine gute Wirksamkeit bei allen Dystonieformen zeigen. Dennoch ist die orale Verabreichung auch hier mit einer systemischen Wirkung und damit mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Diese sind v.a. dosisabhängig und umfassen u.a. Bewusstseinsstörungen, Verwirrtheit oder Gedächtnisstörungen. Mit der Zulassung von BoNT zur Therapie der Dystonien in den 1980er Jahren traten sie in den Hintergrund (Jankovic, 2013).

BoNT werden direkt in die übermäßig aktiven Muskeln injiziert, die durch Elektromyographie aufgesucht werden, und wirken dort durch Unterbinden der Impulsübertragung. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die lokale, individual- und muskelspezifische Therapie mit BoNT der oralen Therapie mit Anticholinergika bei der Symptomminderung beispielsweise im Falle der cervicalen Dystonie (CD) nicht nur ebenbürtig sondern gar überlegen ist, ohne jedoch systemische Nebenwirkungen aufzuweisen (Costa et al., 2005). Nebenwirkungen, die bei der Therapie der CD mit BoNT jedoch auftreten können, sind v.a. Schluckstörungen und eine generelle Schwäche der Halsmuskulatur (Brashear et al., 2000). Diese Nebenwirkungen sind v.a. dosisabhängig bzw. abhängig von der Verteilung des BoNT und können durch mehrere Applikationen kleinerer Dosen reduziert werden (Borodic et al., 1994).

#### **1.4.2.2 Kosmetischer Einsatz von BoNT**

Die Anwendung von BoNT im Rahmen von kosmetischen Eingriffen, v.a. für verjüngende Eingriffe im Gesicht, hat in den letzten zehn Jahren sehr stark an Popularität zugenommen. Grundlage für die fazialen Altersveränderungen ist die Faltenbildung aufgrund von Schwerkraft, Elastizitätsverlust des Gewebes und eine resultierende, relative Überaktivität der zu Grunde liegenden Muskulatur. Diese verursacht Falten, dessen Verlaufsrichtung im

rechten Winkel zum Faserverlauf der Muskulatur steht. Mittels Injektion von BoNT in diese Muskeln lässt sich dieser Faltenbildung entgegenwirken. Die Patienten profitieren für ungefähr vier Monate von dieser Wirkung (Jaspers et al., 2011).

### **1.4.2.3 Therapie der Epilepsie**

Da BoNT aufgrund seines Wirkmechanismus nicht nur die Sekretion von Acetylcholin vermindern, sondern auch andere Neurotransmitter wie beispielsweise Glutamat beeinflussen, sind sie prinzipiell geeignete Kandidaten für die Therapie von Epilepsien (Antonucci et al., 2009). So lässt sich das Bild einer Temporallappenepilepsie, welche durch Schäden am Hippocampus gekennzeichnet sind, im Tierversuch unter der Verwendung von Kainsäure histopathologisch und klinisch nachbilden. So bedingt die Kainsäure aufgrund ihrer Exzitotoxizität den typischen hippocampalen Neuronenuntergang (Suzuki et al., 1995). Werden in diesem Tiermodell Ableitungselektroden in den läsionierten Hippocampus eingebracht, so lassen sich anfallstypische Potentiale ableiten (Antonucci et al., 2008). Diese Potentiale ändern sich drastisch unter der Applikation von BoNT. So sinkt die Anfallsfrequenz, die absolute Anzahl der Anfälle wird reduziert und auch die Dauer der Anfälle nimmt ab. Darüber hinaus minimieren BoNT die durch Kainsäure induzierten exzitotoxischen Schäden am Hippocampus. Diese Effekte zeigen nach 21 Tagen ihr Maximum und beschränken sich ausschließlich auf die Seite der BoNT-Injektion, d.h. es lässt sich in diesem Modell auf der kontralateralen Hirnseite keinerlei BoNT-Aktivität nachweisen. Mit dem Umfang der Wirkung sind BoNT in diesem Zusammenhang den klassischen Epilepsiemedikamenten wie Phenytoin überlegen. Die benötigte Dosis, um diese Wirkung zu erreichen, zeigt hierbei keine Intoxikationserscheinungen bei den Versuchstieren. Lediglich direkt nach der Applikation der BoNT zeigen sich Lernschwierigkeiten, die jedoch, wie auch die generelle Wirkung der BoNT, nur vorübergehender Natur sind (Antonucci et al., 2009; Constantin et al., 2005).

### **1.4.2.4 Neuroprotektion bei ischämischen Schlaganfällen**

Ein Teil des pathologischen Prozesses eines ischämischen Schlaganfalles ist, dass die Blutversorgung einer Region im Gehirn sistiert, was wiederum einen Mangel an Sauerstoff nach sich zieht. Da dieser jedoch von essentieller Bedeutung für die zelluläre

Energieversorgung und diese ihrerseits für die Funktion der aktiven Ionenporter ist, kommt es bei einem Mangel zu einer Depolarisation der betroffenen Zelle. Diese Depolarisation öffnet spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, ein Prozess der jeder Ausschüttung von Neurotransmittern, in diesem Falle v.a. Glutamat, vorausgeht. Das freigesetzte Glutamat akkumuliert im synaptischen Spalt, nicht auch zuletzt aufgrund des Energiemangel bedingten Funktionsverlustes aktiv beseitigender Systeme. Ebenfalls aktiviert das intrazellulär ansteigende Calcium eine Reihe von proteolytischen und Radikal-produzierenden Systemen, die Gewebeschäden hervorrufen. Die ansteigende Glutamatkonzentration aktiviert metabotrope Glutamatrezeptoren, welche über Signalkaskaden zu einem Einstrom von Calcium-, Natrium- und Chloridionen führen. Ersteres hat den oben bereits beschriebenen Effekt. Die letzteren überwiegen mit ihrem Einstrom den Ausstrom von Kaliumionen, verändern dementsprechend, neben der weiter depolarisierenden Wirkung, das osmotische Milieu der Zelle. Der folgende Wassereinstrom und das daraus resultierende Gewebeödem komprimieren umliegendes Gewebe und lösen so auch in diesem eine Situation der Mangelversorgung aus (Dirnagl et al., 1999). Im Tiermodell lässt sich dieser Zustand der Unterversorgung mittels der vasokonstriktorisches wirkenden Substanz endothelin-1 (ET-1) erreichen, welche intrazerebral injiziert wird. Auch hier zeigen die Versuchstiere einen Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration (Bogaert et al., 2000). Unter Verwendung dieses Tiermodells zeigte sich, dass die Applikation von BoNT in die geschädigte Hirnregion, unmittelbar nach der Injektion von ET-1, den Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration unterbindet. So wird die oben bereits beschriebene Kaskade unterbrochen und es kommt zu einer deutlichen Reduktion des im Rahmen eines ischämischen Ereignisses geschädigten Gebietes (Antonucci et al., 2010).

#### **1.4.2.5 Therapie von Schmerzen**

Die Arbeitsgruppe von Chaddock et al. (2004) zeigte, dass sich BoNT auch zur Therapie von Schmerzen auf spinaler Ebene eignen. Schmerzen werden mittels einer Vielzahl von Mediatormolekülen verarbeitet, u.a. auch Substanz P (Dray et al., 1994). Auch Substanz P unterliegt einem SNARE-abhängigen Sekretionsprozess und lässt sich so durch die Applikation von BoNT an den entsprechenden nozizeptiven Afferenzen unterbinden (Welch et al., 2000). Um selektiv nur die Sekretion dieser Neurone zu unterbinden und andere nicht zu beeinflussen, muss die Endoprotease-Untereinheit der regulären BoNT mit einer anderen, der Adressierung dienenden Struktur, verbunden werden, die die Galaktose-reichen

Kohlenhydrate der nozizeptiven Afferenzen selektiv bindet. Die selektive Blockade dieser Afferenzen ermöglicht eine langanhaltende Schmerzunterdrückung, die, anders als die Wirkung von klassischen Schmerzmitteln wie beispielsweise Morphin, bis zu einigen Monaten anhalten kann (Chaddock et al., 2004).

#### **1.4.2.6 Therapie des Morbus Parkinson**

Wie oben bereits erwähnt ist die systemische Therapie mit Anticholinergika zur Minderung der Aktivität der relativ überaktiven cholinergen Interneurone mit einer Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen verbunden. Die direkte Injektion von BoNT in ein betroffenes Striatum könnte hier Abhilfe schaffen.

Im Tiermodell lässt sich die parkinsontypische Degeneration der dopaminergen Neurone mittels 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) erreichen, welches in das mediale Vorderhirnbündel, in das Striatum oder in die Substantia nigra injiziert wird. Besonders die Injektion in das mediale Vorderhirnbündel eignet sich in Hinblick auf das Schädigungsmuster gut als Parkinsonmodell. 6-OHDA weist große Strukturähnlichkeit mit Dopamin auf und wird mittels der selben Transportsysteme in die Zellen aufgenommen. Intrazellulär wird es oxidiert, wobei sich Wasserstoffperoxid und Parachinon bilden. Diese Reaktionsprodukte sind stark toxisch und zerstören die Zelle (Meredith et al., 2008). Der generelle Erfolg der Läsion lässt sich hierbei mit dem Dopaminrezeptoragonisten Apomorphin beurteilen, welcher subkutan appliziert wird. Der Untergang der dopaminergen Neurone führt zu einer Hochregulierung der Expression von postsynaptischen, ipsilateralen Dopaminrezeptoren von striatalen Neuronen, an welche Apomorphin bindet. Systemisch gegebenes Apomorphin aktiviert im läsionierten Striatum mehr Dopaminrezeptoren aufgrund ihres dortigen vermehrten Vorkommens, was zu einer Drehbewegung der Tiere führt, die im Folgenden als Rotation bezeichnet wird. Die Richtung dieser Rotationen weist von der Seite der Schädigung weg (Ungerstedt et al., 1969; Wree et al., 2011). Die Rate der pro Zeiteinheit ausgeführten Rotationen lässt sich durch Injektion von BoNT-A in das 6-OHDA-läsionierte Striatum vermindern. Um den gewünschten Effekt zu erzielen ist bei Versuchsratten eine Dosis von 1 – 2 ng BoNT-A nötig. Kleinere Dosen erwiesen sich als wenig wirksam, größere hingegen als toxisch. Anders als bei der peripheren Anwendung von BoNT hält diese zentrale Wirkung, d.h. die Reduktion der Rotation für bis zu 6 Monate an. Während dieser Zeit treten, die Zellzahl der cholinergen Neurone und das Volumen des Striatums betreffend, keinerlei signifikante strukturelle Veränderungen auf. Hierbei beschränkt sich die Wirkung des Toxins ausschließlich auf das

Injektionsgebiet, d.h. es besteht kein Anhalt für BoNT-Aktivität auf der kontralateralen Seite oder im Bereich der Hirnbasis, d.h. Hypothalamus oder Hirnstamm. Im Einklang mit diesen Ergebnissen bestehen im Tierversuch dementsprechend keine Hinweise für die Störung kognitiver Leistungen oder vegetativer Funktionen durch die Applikation von BoNT. Lediglich ein, nach der Injektion von BoNT auftretendes, gering vermindertes Angstverhalten kann beobachtet werden. Dieses könnte jedoch im Rahmen der Parkinsontherapie von Vorteil sein, da Parkinsonpatienten nicht selten zusätzlich an Depressionen und Angststörungen leiden. Im Rahmen dieser Versuche sind bei histologischen Untersuchungen erstmals axonale Schwellungen aufgefallen, die als BoNT-A-induzierte Varikositäten (BiVs) bezeichnet wurden ( Antipova et al., 2013; Holzmann et al., 2012; Wree et al., 2011).

Eine genauere Beschreibung dieser Varikositäten soll Inhalt der vorliegenden Arbeit sein.

## **1.5 Fragestellung dieser Arbeit**

Die Parkinsonerkrankung stellt eine enorme Beeinträchtigung für die darunter leidenden Patienten dar. Dennoch sind bisher vorhandene Therapieformen mit einer Fülle an unerwünschten, negativen Nebenwirkungen verbunden, die diese Therapieformen bestenfalls als Kompromiss erscheinen lassen. Es zeigt sich nun jedoch, dass BoNT-A im Tiermodell aufgrund seiner anticholinergen Wirkung auf die striatalen Interneurone dazu in der Lage ist, viele parkinsontypische Beschwerden zu minimieren, ohne dieses große Spektrum an Nebenwirkungen aufzuweisen. Die intrastriatale Injektion von BoNT in betroffene Gehirne könnte so, trotz des Rufes der BoNT als giftigste bekannte Substanzen, eine wirkliche Alternative in der Behandlung des Morbus Parkinson darstellen. Fragestellungen aktueller Arbeiten zielen hierbei darauf ab, ob und wenn ja wie sich die zelluläre Integrität bei intrazerebraler Injektion von BoNT-A verhält.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es hierbei, zu klären, wie sich die Struktur des Striatums, genauer die kürzlich von Wree et al. (2011) beschriebenen, durch Botulinumtoxin induzierten Varikositäten im zeitlichen Verlauf bezüglich ihrer numerischen Dichte und ihres Volumens verhalten. Auch sollen Diskussion bezüglich der möglichen Herkunft und des unterschiedlichen Verteilungsmuster der ChAT- und TH-positiven Varikositäten angestellt werden.

Hierzu erhielten Wistar-Ratten einseitig intrastriatale Injektionen von BoNT-A und ihre

Gehirne wurden nach immunhistochemischer Färbung, die numerische Dichte und die Volumina der Varikositäten betreffend, im zeitlichen Verlauf histologisch und stereologisch analysiert.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Verwendete Tiere**

Die verwendeten Hirnschnitte, bzw. die Hirne aus welchen diese angefertigt wurden, stammen von jungen, adulten, männlichen Wistar Ratten, die zum Zeitpunkt der Operation ein Gewicht von 270-320g aufwiesen. Bezogen wurden diese Tiere von der Firma Charles River WIGA aus Sulzfeld, Deutschland. Die Haltung der Tiere erfolgte in klimakontrollierten Räumen bei einer konstanten Temperatur ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Weiterhin wurde ein jeweils 12 Stunden dauernder Hell/Dunkel Rhythmus eingehalten. Die Tiere hatten jederzeit uneingeschränkten Zugriff auf Wasser und Nahrung und wurden gemäß den gesetzlichen Tierschutzbestimmungen gehalten und behandelt.

### **2.2 Intrazerebrale Applikation von BoNT-A**

Die intrazerebrale Injektionen des BoNT wurden von Dr. Wree und Dr. Mix durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde 1 ng BoNT-A verwendet, eine Dosis die sich im Vorfeld als optimal herausgestellt hat (Wree et al., 2011).

Vor der intrazerebralen Injektion von BoNT-A wurden die Tiere mit einer Mischung aus Ketamin (50mg/ kg KG) und Xylazin (4mg/ kg KG), welche intraperitoneal injiziert wurde, narkotisiert.

Das verwendete BoNT-A wurde über einen Händler von der Firma List Biological Laboratories, INC bezogen. Zur Herstellung der Injektionslösung wurden zunächst 10 µg pulverförmiges BoNT-A in einer Lösung aus 200 µl Phosphatpuffer (PBS), die 0,1 % BSA enthielt, gelöst. Die hergestellte Lösung wurde tiefgefroren. Am Injektionstag wurde die Lösung aufgetaut und auf die Dosis von 0,5 ng/ µl verdünnt.

Für die Injektion wurde der Kopf der jeweiligen Ratte in einem stereotaktischen Apparat (Kopf©, Tujunga, CA, USA) in der so genannten „Flat Skull“ Stellung fixiert. Hierbei wurden zum Einen zwei Stifte („Ear-bars“) in die Gehörgänge eingeführt und zum Anderen die „Tooth-bar“ hinter die oberen zwei Inzisiven eingehakt.

Die Injektion wurde an zwei Punkten im rechten Striatum durchgeführt, die in Bezug auf

Bregma die folgenden Koordinaten aufwiesen:

1. Injektionsstelle: anterior/posterior +1,3mm; lateral -2,6 mm; ventral -5,5 mm
2. Injektionsstelle: anterior/posterior -0,4 mm; lateral -3,6 mm; ventral -5,5 mm

An diese Koordinaten wurde jeweils 1 µl Injektionslösung injiziert, die je 0,5 ng BoNT-A enthielt. Hierbei wurde jede Injektion in insgesamt vier Minuten durchgeführt, in Schritte zu je 0,25 µl pro Minute. Nach Verabreichung beider Volumina wurde die Injektionskanüle noch für weitere vier Minuten an den jeweiligen Koordinaten belassen, um eine vollständige Diffusion des BoNT-A zu gewährleisten.

### **2.3 Tötung der Tiere und Fixierung ihrer Gehirne**

Die Versuchstiere wurden mit einer Überdosis aus Ketamin und Xylazin getötet. Anschließend wurde das rechte Herzohr und der linke Ventrikel eröffnet. Dann wurde nacheinander mit 50 ml einer 0,9%-iger Natriumchloridlösung und mit 300 ml einer Lösung bestehend aus PBS (0,1M, pH 7,4) und 3,7%-igen Paraformaldehyd über eine Glaskanüle, die in die Aorta über den linken Ventrikel eingeführt wurde, der Körperkreislauf zur Fixierung perfundiert. Im Folgenden wurden die Gehirne entnommen und für eine weitere Nacht bei 4°C in 3,7%-iger Paraformaldehydlösung nachfixiert. Mittels einer Lösung aus PBS und 20% Saccharose wurden die Gehirne folgend entwässert und kryoprotectiert. Daraufhin wurden sie unter Verwendung von -50°C kaltem Isopentan schockgefroren und bei -80°C zwischengelagert. Die Tötung der Tiere erfolgte je nach Zeitgruppenzugehörigkeit nach 14 Tagen, nach einem Monat, nach drei Monaten, nach sechs Monaten, nach neun Monaten und nach 12 Monaten nach der BoNT-Injektion. Entsprechend dieser Zeiten erfolgte die Gruppeneinteilung der Tiere.

### **2.4 Anfertigung von histologischen Parallelschnitten der Versuchstiergehirne**

Die Anfertigung der Schnitte für die sich anschließende immunhistochemische Färbung wurde unter Verwendung eines Gefriermikrotoms durchgeführt. Hierzu wurden die Gehirne



mit der Medulla oblongata auf einem Stempel des Mikrotoms mittels Tissue Freezing Medium® (Jung, Deutschland) fixiert. Dieser wurde folgend in den Objekthalter des Mikrotoms eingespannt und derart justiert, dass frontale Parallelschnitte angefertigt werden konnten. Die so erzeugten 30 µm dicken Hirnschnitte wurden von der Klinge bzw. vom Auffangtisch entweder direkt auf einen Super Frost plus Objektträger aufgebracht oder aber mit einem Pinsel in mit Kryoprotektionslösung, bestehend aus PBS (0,1M, pH 7,4), Glycerol (85%) und Ethylenglykol (99%), befüllte, 48-Well Gewebekulturschalen überführt, wobei in diesem Falle aufgrund der Schnittanzahl manche Wells mehrfach belegt wurden. Letztendlich wurden auf diesem Wege sieben Schnittserien hergestellt. Hierbei wurde so vorgegangen, dass der erste und darauf folgend jeder siebte Hirnschnitt auf einen Objektträger verbracht wurde. Der zweite und davon ausgehend jeder siebte und entsprechend fortlaufend der dritte (vierte, fünfte, etc.) und wiederum davon ausgehend jeder siebte Schnitt wurden jeweils in eigene Wells überführt. Die nach dem Schneiden auf Objektträgern befindlichen Schnitte wurden im Anschluss Nissl gefärbt. Sie dienten aufgrund der exakten Reihenfolge u.a. zur erneuten, späteren Anordnung der übrigen Serien, welche bis zur immunhistochemischen Färbung bei -20°C in Kryoprotektionslösung gelagert wurden.

## **2.5 Immunhistochemische Färbung**

Im Anhang dieser Arbeit befindet sich eine Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper, sowie aller anderen verwendeten Materialien.

### **2.5.1 Anfärbung Cholinacetyltransferase (ChAT)-positiver Strukturen**

Die Cholinacetyltransferase befindet sich im Cytosol der jeweiligen Nervenendigungen und bildet aus Cholin und Acetyl-CoA das als Neurotransmitter fungierende Acetylcholin. Antikörper, die gegen dieses Enzym gerichtet sind, markieren entsprechend cholinerge Strukturen.

Für diese Färbung wurden die zuvor angefertigten Hirnschnitte aus der Kryoprotektionslösung genommen und zunächst in, mit jeweils 2 ml PBS (0,1M, pH 7,4) pro Well, befüllte 24-Well Gewebekulturplatten überführt und für 10 Minuten gewaschen. Die

Überföhrungen wurden stets mit einem feinen Pinsel durchgeföhrt. Um falsch-positive Anfärbungen zu minimieren wurde darauf folgend die endogene Peroxidase geblockt. Dies geschah wiederum in 24-Well Platten unter Verwendung einer Lösung aus PBS und 3% Wasserstoffperoxid, in welcher die Schnitte für 10 Minuten belassen wurden. Anschließend wurden die Hirnschnitte erneut für je 10 Minuten gewaschen. Hierzu wurde zunächst in PBS und folgend in einer Lösung aus PBS und 0,3% Triton X-100 genutzt. Zum Abblocken von unspezifischen Bindungsstellen wurde nun normales Kaninchenserum (NRS) verwendet. Dieses befand sich in einer 5%-igen Lösung mit PBS, mit welcher 48-Well Platten zu je 250 µl pro Well befüllt wurden. Die eigentliche Inkubation mit dem primären Anti-ChAT-Antikörper erfolgte dann über Nacht bei einer Temperatur von 4°C. Hierbei befand sich der Antikörper in einem Verhältnis von 1:200 in einer Lösung aus PBS, sowie 1% NRS und 0,2% Triton X-100. Die Schnitte wurden während der Inkubation durch einen Orbitalschüttler in ständiger Bewegung gehalten. Am folgenden Morgen wurden diese zweimal mit PBS gewaschen um überschüssige Antikörper zu entfernen. Auch die Inkubation mit dem biotinyliertem sekundären Antikörper erfolgte bei 4°C unter Bewegung über Nacht. Der sekundäre Antikörper befand sich in einem Verhältnis von 1:250 in einer Lösung wie sie auch für den primären Antikörper genutzt wurde. Für beide Inkubationsschritte wurde wiederum auf die 48-Well Gewebekulturplatten zurückgegriffen. Auf Rinderserumalbumin zur Minimierung hydrophober Interaktionen wurde aufgrund der Gefahr von Kreuzreaktionen jeweils verzichtet. Erneut wurden die Schnitte am Folgetag zweimalig mit PBS gereinigt um ungebundene Antikörper zu entfernen. Daraufhin wurden sie für 1 h in einer Avidin/Biotin-Peroxidase-Complex (ABC-Komplex) inkubiert. Hierbei bindet Avidin zum Einen am biotinylierten sekundären Antikörper und zum Anderen mit weiteren freien Untereinheiten die biotinylierte Peroxidase bindet. Auch hier wurden 48-Well Platten benutzt. Für diese wurde eine Lösung aus PBS und Reagenz A und B zu einem Verhältnis der Reagenzien zu je 1:50 angesetzt, welche vor der eigentlichen Inkubation für 30 Minuten reagierte. Im Anschluss an diese Inkubation wurden die Hirnschnitte zweimal mit PBS gewaschen, welchem jedoch zur Kontrastverstärkung des Färbeergebnisses 0,004% Ammoniumnickelsulfat zugesetzt wurden. Folgend wurden sie für 13 Minuten in der Färbelösung belassen. Diese setzte sich aus PBS, 0,04% Ammoniumnickelsulfat, 0,004% Ammoniumchlorid, 10 mg Diaminobenzidin (DAB) pro 100 ml PBS und 1 µl 35%-iges Wasserstoffperoxid pro 100 ml PBS zusammen. Die Peroxidase des ABC-Komplexes oxidierte das DAB, wodurch sich ein braunes, wasserunlösliches Präzipitat bildete. Dieses erschien aufgrund des Ausfalls von Nickelionen zur Kontrastverstärkung blau-violett bis schwärzlich. Abschließend wurden die Hirnschnitte

mit PBS gewaschen und auf Objektträger aufgebracht. Hierbei wurden für die letzten Schritte jeweils 24-Well Platten benutzt. Die Objektträger bzw. die aufgetragenen Präparate wurden anschließend getrocknet und dann mit einer Alkoholreihe zunehmender Konzentration (Propanol 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) entwässert und nach zweimaligem, je 10 minütigem Bad in Xylol unter Verwendung des Eindeckmediums Depex mit einem Deckglas versehen.

### **2.5.2 Anfärbung Tyrosinhydroxylase (TH)-positiver Strukturen**

Die Tyrosinhydroxylase ist eines der Schlüsselenzyme der Katecholaminbiosynthese. Unter Mitwirkung des Coenzym Tetrahydrobiopterin, zweiwertigen Eisens und molekularen Sauerstoffs synthetisiert sie aus der Aminosäure Tyrosin das Dihydroxyphenylalanin (Dopa). Dieses wiederum ist ein Substrat der aromatischen L-Aminosäure-Decarboxylase (Dopa-Decarboxylase), welche Dopa zu Dopamin decarboxyliert. Dopamin seinerseits ist über Hydroxylierung, bzw. Hydroxylierung und Methylierung Ausgangsstoff für die weitere Biosynthese der beiden Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin.

Hier diente die Tyrosinhydroxylase als Marker dopaminerger Strukturen. Diese Färbung wurde strukturgleich zur Färbung gegen ChAT-positive Strukturen durchgeführt. Die einzigen Unterschiede lagen hierbei in der Verwendung unterschiedlicher primärer und sekundärer Antikörper. Wiederum erfolgte unter Ammoniumnickelsulfat-Verstärkung die Anfärbung mit DAB.

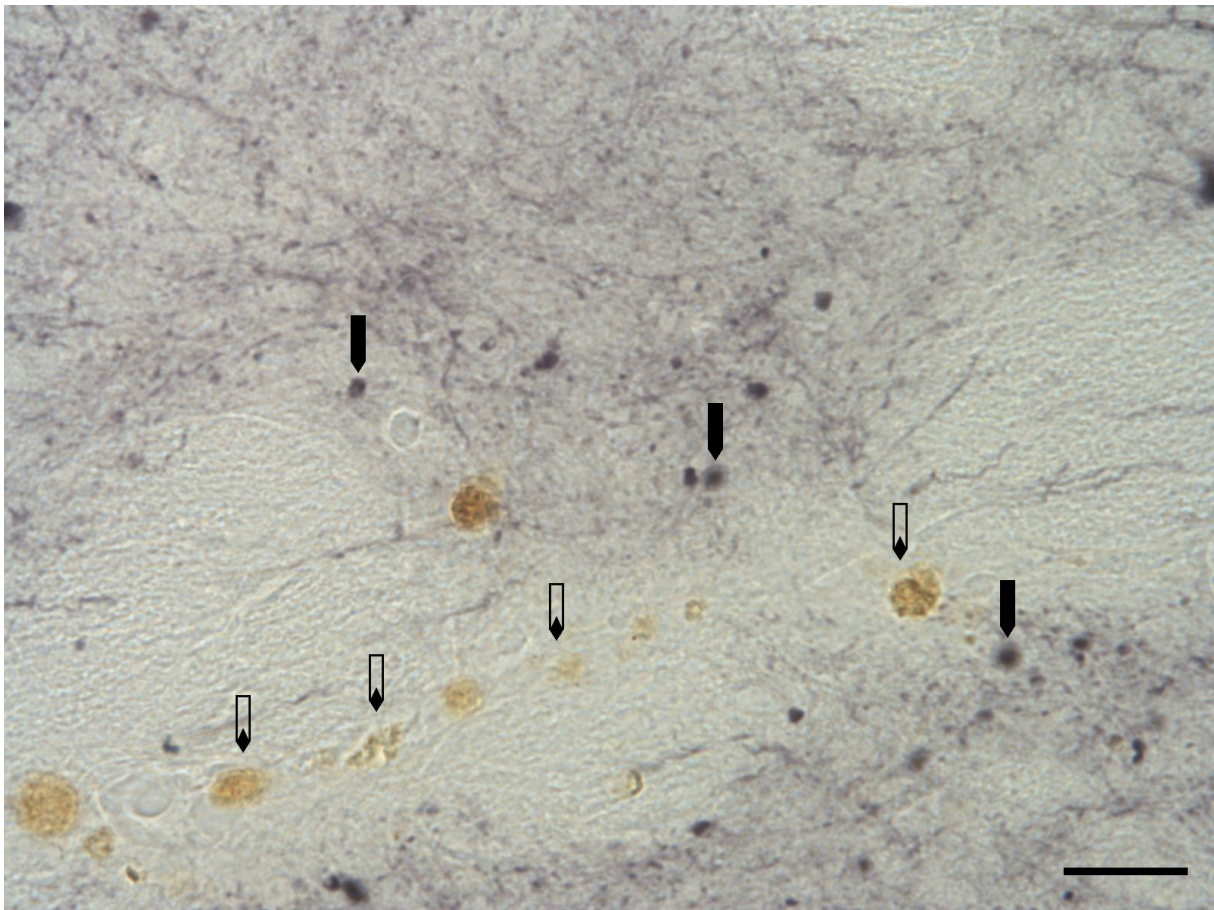
### **2.5.3 Sortierung der Hirnschnitte**

Die einzelnen Wells, der zum Färben der Hirnschnitte verwendeten Gewebekulturplatten, wurden aufgrund der Anzahl der vorliegenden Hirnschnitte zum Teil mehrfach belegt. So kam es vor, dass bis zu drei Schnitte pro Well anzufinden waren. Dies wiederum führte dazu, dass sich deren ursprüngliche Reihenfolge, ihre Anordnung im Ursprungshirn betreffend, an sich nicht im Detail rekonstruieren ließ. Da diese Anordnung jedoch wesentliche Bedeutung für die Auswertung hatte wurden die gefärbten Schnitte im Nachhinein mittels der exakt der Reihenfolge nach angeordneten, direkt nach dem Schnitt auf Objektträger aufgenommenen Nissl-Präparate neu sortiert. Dies betraf sowohl die gegen die ChAT als auch gegen die TH gefärbten Hirnschnitte.

## 2.6 Stereotaktische Auswertung der BiVs

### 2.6.1 Zählung der BiVs für die anschließende Dichtebestimmung

Aus den gegen die TH und ChAT angefärbten, parallelen Hirnschnitten, bei welchen es sich jeweils um den siebten Schnitt eines komplett geschnittenen Rattenhirnes handelte, wurden je fünf Schnitte für die Auszählung BiVs ausgewählt. Hierzu wurden alle Schnitte einer Färbung zunächst mittels eines Mikroskops bei geringer Vergrößerung begutachtet und jener Hirnschnitt ausgewählt, bei welchem der, durch die BoNT-A-Injektion erzeugte Injektionskanal die größte Ausdehnung aufwies. Dieser Injektionskanal war aufgrund kalziumsalzhaltiger Makrophagen leicht und eindeutig ausmachbar. Diese Makrophagen befanden sich entlang der Ausdehnung des Injektionskanals. (**Abbildung 2**)



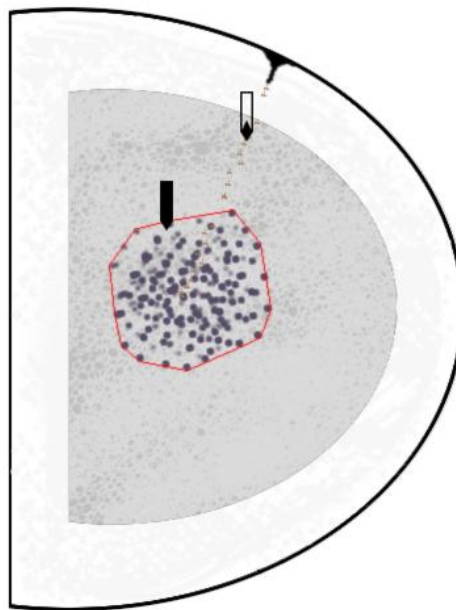
**Abbildung 2:** Darstellung eines Injektionskanals in einem gegen die TH gefärbten Hirnschnitt. Die gefüllten Pfeile markieren exemplarisch vereinzelte botulinumtoxininduzierte Varikositäten. Die durchscheinenden Pfeile markieren exemplarisch Makrophagen, die durch eingelagerte Kalziumsalze gelb-bräunlich erscheinen. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Folgend wurden unter Zuhilfenahme der exakt angeordneten Nissl-gefärbten Präparate jeweils die zwei direkt vor und nach diesem Injektionskanalschnitt liegenden Schnitte für die weitere

Auswertung ausgewählt.

Für die Zählung der Varikositäten wurde das Auswertprogramm StereoInvestigator (MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA) herangezogen. Dieses Programm war auf einem Windows-basierten Computer installiert, der mit einem digital ansteuerbarem Objektträgertisch (MT12, Heidenhain, Traunreut, Deutschland), einem Mikroskop (BX 51, Olympus, Tokyo, Japan) und einer Digitalkamera (CX9000, MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA) verbunden war.

Zu Beginn der eigentlichen Auswertung wurde innerhalb eines jeden Schnittes ein Bereich festgelegt, innerhalb dessen ausgewertet werden sollte. Hierzu wurde sowohl für die TH- als auch die ChAT-Schnitte ein 2xObjektiv verwendet. Aufgrund unterschiedlicher Verteilung der Varikositäten wurde dieser Bereich bei den TH- und den ChAT-positiven Hirnschnitten unterschiedlich gewählt. Bei den gegen die TH gefärbten Schnitten lag der Auswertbereich um den Injektionskanal herum. Es wurde hier der Bereich durch die subjektiv am weitesten vom Injektionskanal entfernten Varikositäten definiert (**Abbildung 3**).

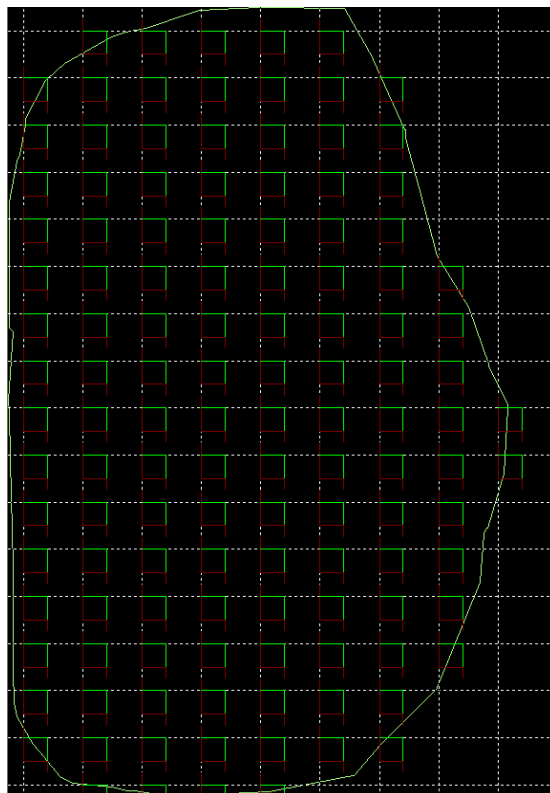


**Abbildung 3:** Schematische Darstellung zur Festlegung des TH-Auswertbereiches. Dargestellt ist eine Hemisphere eines Rattenhirnes mit Striatum (hellgrau). Der gefüllte Pfeil markiert ein Feld von Varikositäten. Die rote Linie symbolisiert die Festlegung des Auswertbereiches anhand der am weitesten außen liegenden Varikositäten. Der durchscheinende Pfeil markiert den Einstichpunkt und den Injektionskanal der BoNT-Injektion.

Im Falle der gegen die ChAT gefärbten Schnitte umfasste dieser Bereich das gesamte CPU. Innerhalb des StereoInvestigator-Programms wurden diese Bereiche für jeden Schnitt einzeln virtuell markiert. Folgend wurde für den markierten Bereich innerhalb des Programms ein

Zählraster definiert, in welchem im Falle der gegen die ChAT gefärbten Schnitte in horizontaler Richtung alle 300  $\mu\text{m}$  und in vertikaler Richtung alle 240  $\mu\text{m}$  ein 40  $\mu\text{m}$  x 40  $\mu\text{m}$  großes Zählfenster platziert wurde (**Abbildung 4**). Da der markierte Bereich bei den gegen die TH gefärbten Schnitten kleiner ausfiel, wurde hier ein Raster gewählt bei dem ein gleich großes Zählfenster in horizontaler Richtung alle 100  $\mu\text{m}$  und in vertikaler Richtung alle 80  $\mu\text{m}$  aufzufinden war. Gezählt wurden alle Varikositäten, die innerhalb des Zählfensters oder aber direkt auf der oberen oder linken Begrenzung des Fensters lagen. Verwendet wurde hierfür ein 60xObjektiv. Als Varikositäten wurden jene Strukturen gewertet, die annähernd kreisförmig waren, eine glatte Begrenzung aufwiesen, gleichmäßig angefärbt erschienen und in ihrer Größe klar vom Hintergrund abzugrenzen waren. Diese Strukturen fanden sich des Weiteren gelegentlich in Assoziation zu ebenfalls angefärbten axonalen Fasern und unterschieden sich von eventuell sichtbaren Somata vorhandener Neurone durch fehlende weitere Fortsätze und ein runderes Erscheinungsbild.

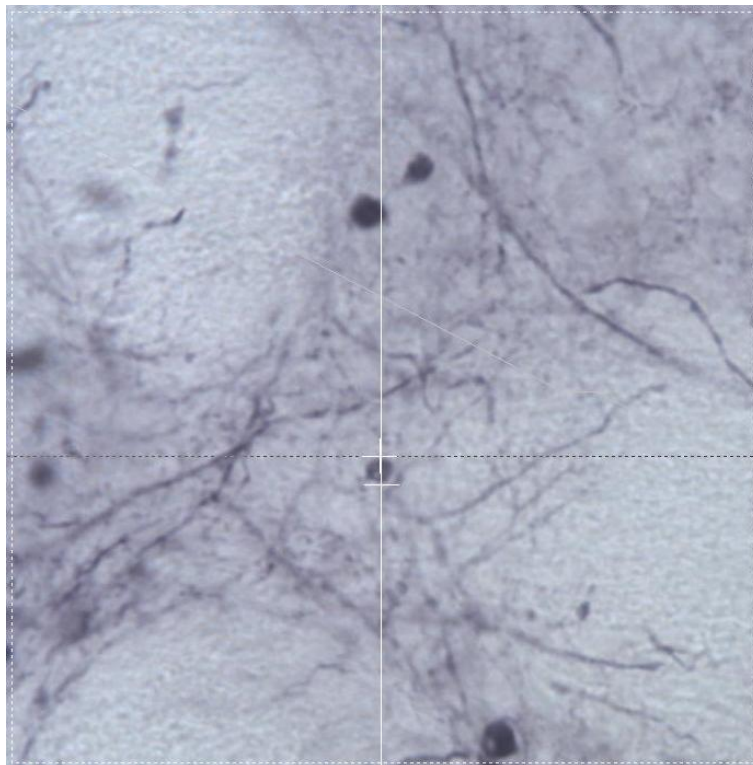
Ausgewertet wurden nur die rechten Hemisphären von insgesamt 31 gegen die ChAT (**Tabelle 1A**) und 34 gegen die TH (**Tabelle 2A**) gefärbten Rattengehirnen, da auf der linken unbehandelten Hemisphäre nie BiVs aufzufinden waren.



**Abbildung 4:** Darstellung eines Zählrasters. Unter Verwendung des Programms StereoInvestigator wurde zunächst die Region umfahren, innerhalb welcher folgend die Auszählung stattfand (hellgrüne, durchgezogene Linie). Folgend wurde, wie im Text erwähnt, das Zählraster definiert.

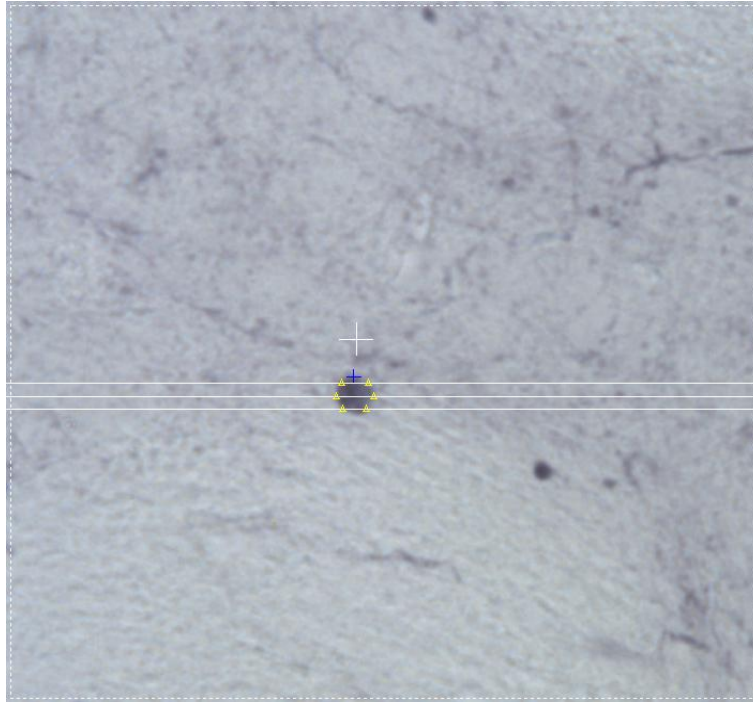
## 2.6.2 Vermessung der Varikositäten und Ermittlung deren Volumens

Während der oben beschriebenen Auszählung der Varikositäten wurde bei ihnen parallel das Volumen bestimmt. Hierfür wurde eine interne Funktion des Auswertprogrammes StereoInvestigator, der so genannte „Planar Rotator“, verwendet. Hierbei wurden zunächst je die obere und untere Grenze der Varikositäten festgelegt (**Abbildung 5**).



**Abbildung 5:** Festlegung der unteren und oberen Begrenzung des „Planar Rotator“ bei einer Varikosität innerhalb des Programms StereoInvestigator.

Entsprechend der zuvor getroffenen Einstellung legte das Programm automatisch drei parallele Linien mit identischem Abstand horizontal zwischen die Abgrenzungen. Folgend konnte nun, mit sechs manuell auf diesen Linien platzierten Markierungen, der Umfang einer jeden Varikosität festgelegt werden (**Abbildung 6**). Dieser wurde vom Programm daraufhin genutzt, um das Varikositätenvolumen zu berechnen.



**Abbildung 6:** Messung des Umfangs einer Varikosität auf drei parallelen Linien mittels sechs Punkten innerhalb des Programms StereoInvestigator.

### 2.6.3 Statistik

Die statistische Analyse des zeitlichen Verlaufs sowohl der Dichte als auch des Volumens der gezählten und vermessenen Varikositäten wurde mittels zweiseitigem Student's T-Test für ungepaarte Beobachtungen durchgeführt. Hierbei wurden zunächst die Mittelwerte der einzelnen Zeitgruppen gebildet und darauf folgend stets jede Zeitkategorie mit der nächsten und jede einzelne mit den Werten, die bei den 14-Tages Tieren ermittelt wurden, verglichen. Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  sind hierbei als signifikant anzusehen.

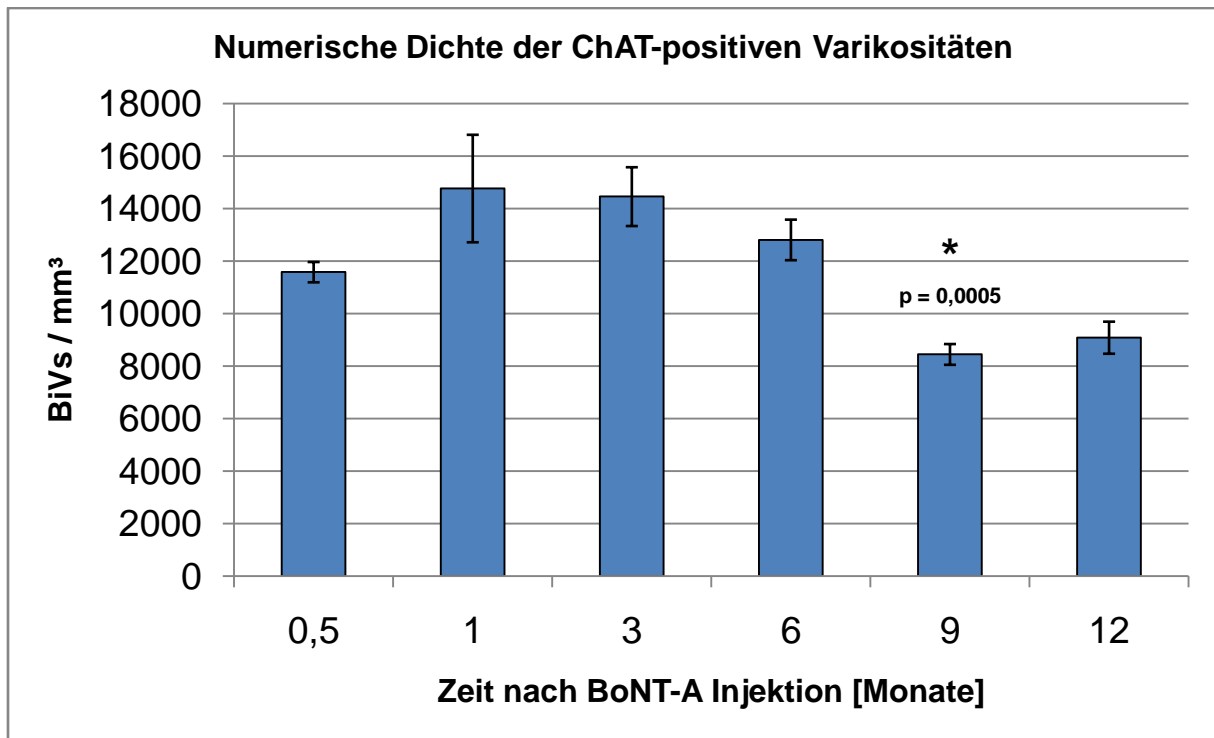


## 3. Ergebnisse

### 3.1 Zeitliche Veränderungen der numerischen Dichte der ChAT-positiven BiVs

Zur Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der Veränderung der numerischen Dichte der ChAT-positiven Varikositäten wurden die rechten Striata von insgesamt 31 Tieren vermessen, die sich in sechs Zeitgruppen aufteilen.

Es zeigt sich, dass bei einer intrastriatalen Injektion von 1 ng BoNT-A die numerische Dichte der induzierten Varikositäten im beobachteten 12-Monats Verlauf insgesamt statistisch signifikant abnimmt. Im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der numerischen Varikositätendichte aller Zeitgruppen besteht so ein negativer Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient von  $r = -0,78$ . Hierbei liegt die numerische Dichte der Varikositäten der 14-Tages Tiere bei  $11582 \pm 387$  BiVs/mm<sup>3</sup> (durchschnittliche Varikositätendichte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes), welche im direkten Vergleich mit den 12-Monats Tieren statistisch signifikant ( $p = 0,006$ ) auf  $9085 \pm 611$  BiVs/mm<sup>3</sup> absinkt (**Diagramm 1; Tabelle 3A; Tabelle 4A; Abbildung 7**). Im Vergleich der einzelnen Zeitgruppen mit der jeweils chronologisch vorausgehenden besteht jedoch erst relativ spät, d.h. beim Vergleich der 6-Monats mit den 9-Monats Tieren ein statistisch signifikanter Abfall der numerischen Varikositätendichte. Zunächst steigt die numerische Dichte im Vergleich der 14-Tages Tiere mit den 3-Monats Tieren statistisch signifikant ( $p = 0,02$ ) auf  $14459 \pm 1120$  BiVs/mm<sup>3</sup> an. Folgend unterliegt die Dichte im Vergleich der 3-Monats mit den 6-Monats Tieren einer statistisch nicht signifikanten Dichteabnahme, um dann jedoch, im Falle der 9-Monats Tiere, statistisch signifikant auf  $8849 \pm 395$  BiVs/mm<sup>3</sup> ( $p = 0,0005$ ) abzufallen. Nach diesem Abfall unterliegt die Dichte im Vergleich der 9-Monats Tiere mit den 12-Monats Tieren keiner weiteren statistisch signifikanten Veränderung.



**Diagramm 1: Zeitlicher Verlauf der numerischen Dichte der ChAT-positiven BiVs nach Injektion von 1 ng BoNT-A**

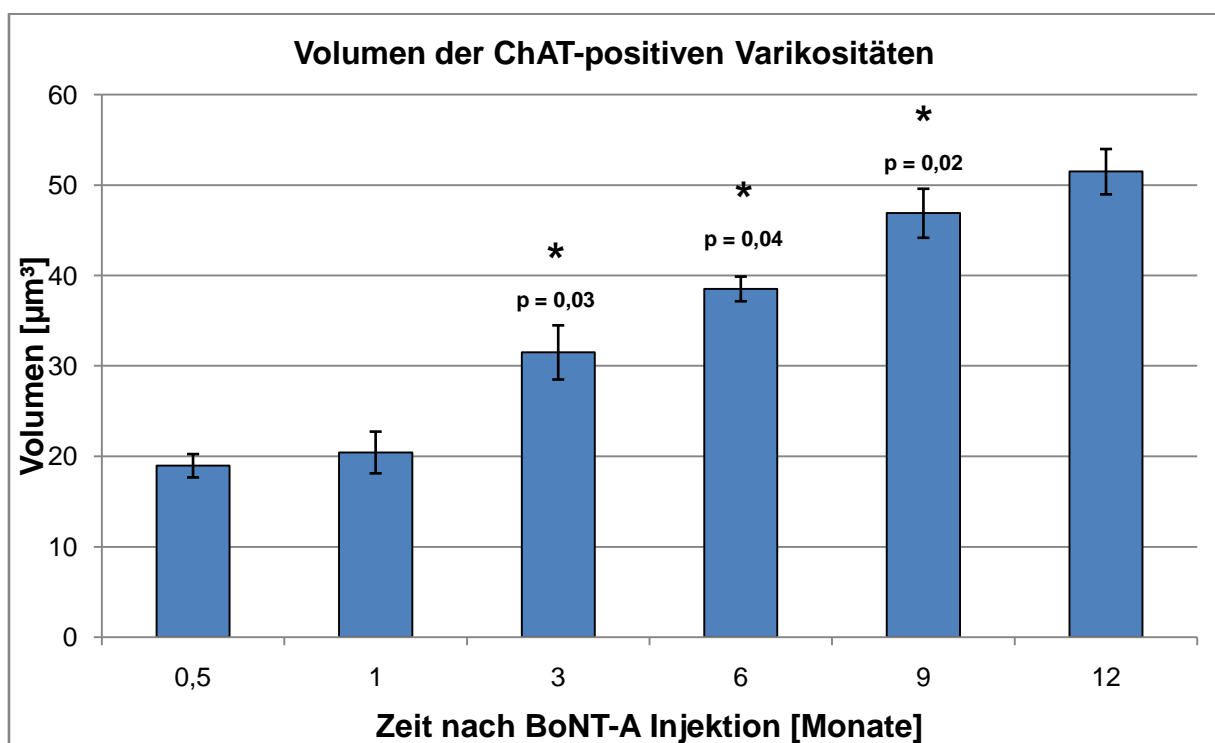
Angegeben ist die jeweilige Dichte der ChAT-positiven BiVs. Es zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine abnehmende Dichte. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler des Mittelwertes an. \* Symbolisiert einen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der vorherigen Zeitgruppe.

### 3.2 Zeitliche Veränderungen des Volumens der ChAT-positiven BiVs

Bei der Auswertung der Veränderung der mittleren Volumina der ChAT-positiven Varikositäten im zeitlichen Verlauf wurden dieselben 31 Tiere vermessen, welche für die Bewertung der numerischen Dichte dienten.

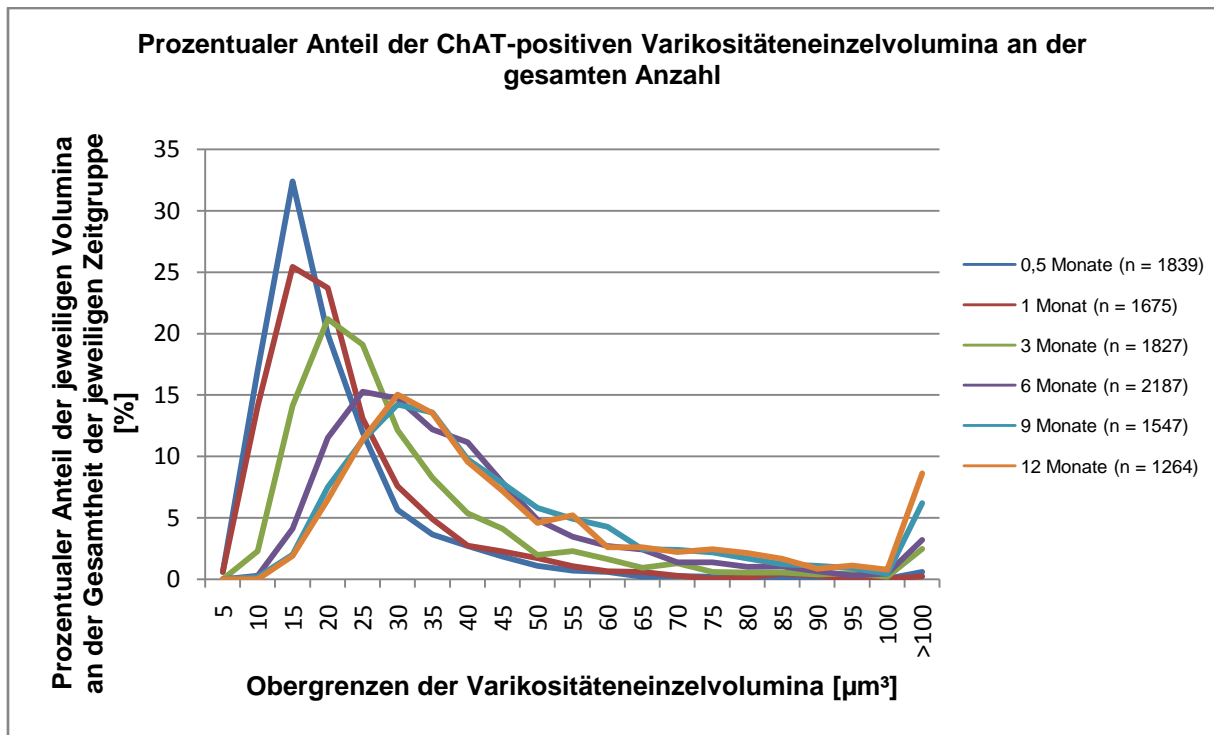
Es zeigt sich, dass bei einer intrastriatalen Injektion von 1 ng BoNT-A das mittlere Volumen der induzierten Varikositäten im beobachteten 12-Monats Verlauf insgesamt statistisch signifikant zunimmt. Im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der mittleren Varikositätenvolumina aller Zeitgruppen besteht so ein positiver Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient von  $r = 0,98$ . Hierbei liegt das mittlere Varikositätenvolumen der 14-Tages Tiere bei  $18,96 \pm 1,29 \mu\text{m}^3$  (mittleres Varikositätenvolumen  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes), welches im Falle der 12-Monats Tiere statistisch signifikant ( $p = 0,000001$ ) auf  $51,49 \pm 2,51 \mu\text{m}^3$  ansteigt (**Diagramm 2; Tabelle 5A; Tabelle 6 A; Abbildung 7**). Zwar besteht zwischen dem mittleren Volumen der 14-Tages Tiere und dem mittlerem Volumen der 1-Monats Tiere noch kein signifikanter Unterschied, jedoch sind die nach einem Monat

auftretenden Veränderungen bis hin zu den 9-Monats Tieren sowohl im Vergleich zu der jeweiligen nachfolgenden Zeitgruppe als auch im Vergleich der jeweiligen Zeitgruppe mit den 14-Tages Tieren signifikant. Lediglich zwischen den 9-Monats-Tieren und den 12-Monats-Tieren sind dann keine signifikanten Unterschiede mehr nachweisbar (**Tabelle 6A**). Im zeitlichen Verlauf nimmt neben dem mittleren Varikositätensvolumen die Anzahl großer Varikositäten zu. So ist diesbezüglich bei den 14-Tages Tieren ein Maximum des Varikositätenanteils bei einem Volumen um  $15 \mu\text{m}^3$  anzufinden, während diese bei den 12-Monats Tieren bei  $30 \mu\text{m}^3$  liegt. Ferner nimmt der prozentuale Anteil kleinerer Varikositäten im Verlauf ab (**Diagramm 3; Tabelle 7A**).



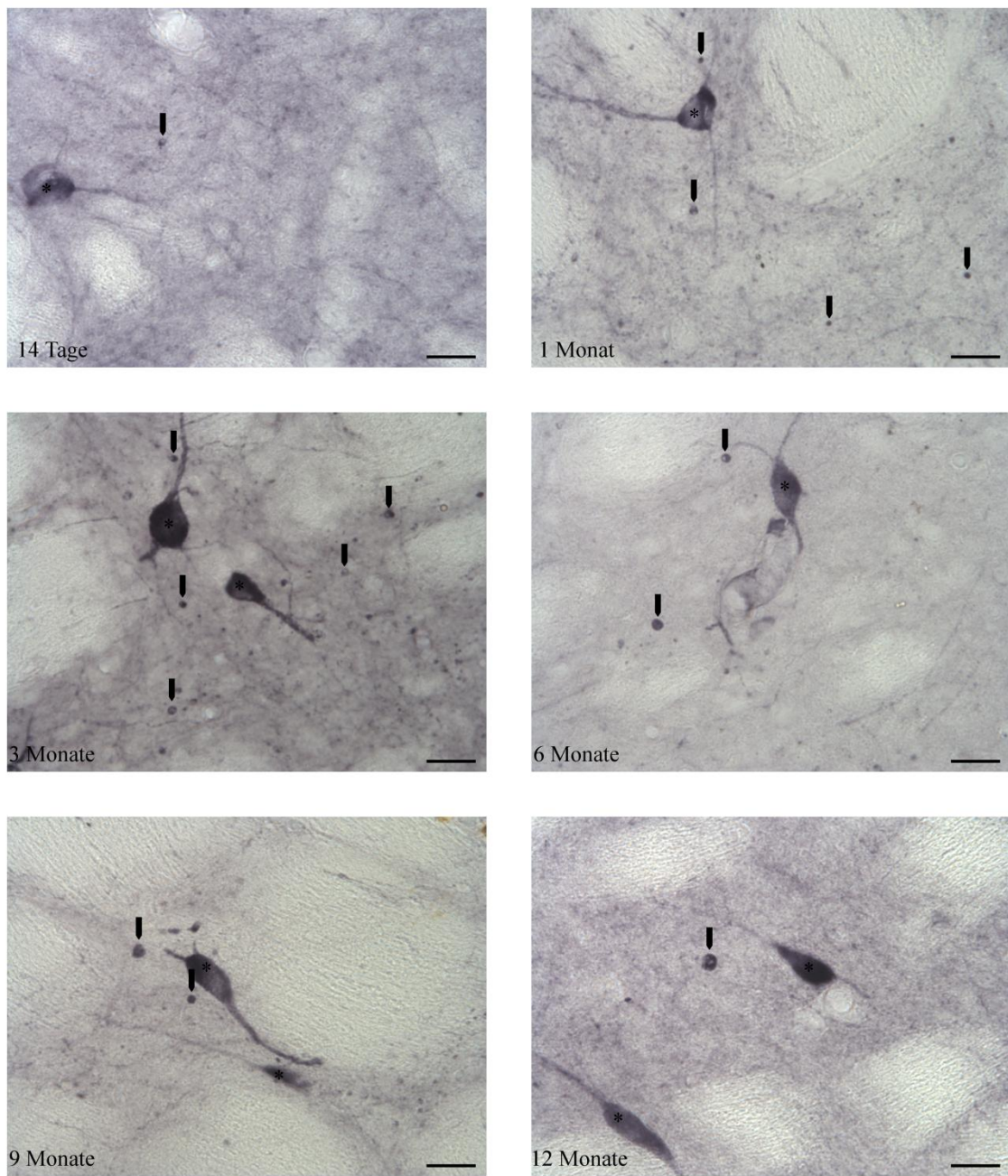
**Diagramm 2: Zeitlicher Verlauf des Volumens der einzelnen ChAT-positiven BiVs nach Injektion von 1 ng BoNT-A**

Angegeben ist das jeweilige Volumen der ChAT-positiven BiVs. Es zeigt sich im zeitlichen Verlauf ein zunehmendes Volumen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler des Mittelwertes an. \* Symbolisiert einen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der vorherigen Zeitgruppe.



**Diagramm 3: Prozentualer Anteil einzelner Varikositätenvolumina an der gesamten Anzahl pro Zeitgruppe ausgemessener Varikositäten**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil, den das jeweiligen Einzelvolumen an der Gesamtheit der pro Zeitgruppe ausgemessenen Varikositäten aufweist. Die Legende zeigt neben den einzelnen Zeitgruppen diese Gesamtheit (n). Zur Erfassung des Volumens wurden Kategorien erzeugt, dessen jeweilige Obergrenzen im Diagramm dargestellt werden. So befinden sich in jeder Kategorie die Volumina zwischen und einschließlich der bezeichnenden Obergrenze und der vorhergehenden Obergrenze.

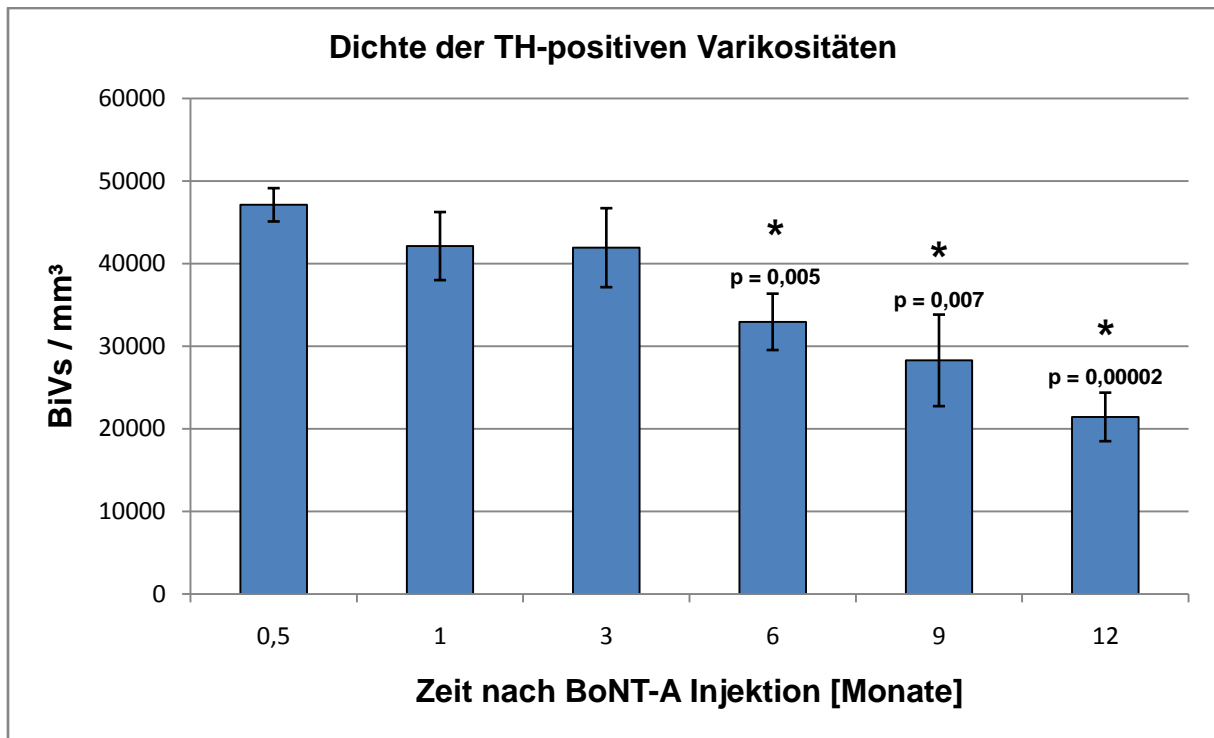


**Abbildung 7:** ChAT-positive Varikositäten im zeitlichen Verlauf. Dargestellt sind Bereiche aus gegen die ChAT gefärbten Hirnschnitten. 60fache Vergrößerung. Die Pfeile markieren ChAT-positive Varikositäten. Die Sterne markieren ChAT-positive Neurone. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 Zeitliche Veränderungen der numerischen Dichte der TH-positiven BiVs

Zur Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der Veränderung der numerischen Dichte der TH-positiven Varikositäten wurden die rechten Striata von insgesamt 34 Tieren ausgewertet, die sich in 6 Zeitgruppen aufteilen.

Es zeigt sich, dass bei einer intrastriatalen Injektion von 1 ng BoNT-A die numerische Dichte der induzierten Varikositäten im beobachteten 12-Monats Verlauf insgesamt statistisch signifikant abnimmt. Im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der numerischen Varikositätendichte aller Zeitgruppen besteht so ein negativer Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient von  $r = -0,98$ . Hierbei liegt die numerische Dichte der Varikositäten der 14-Tages Tiere bei  $47125 \pm 2015$  BiVs/mm<sup>3</sup> (durchschnittliche Varikositätendichte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes), welche im Falle der 12-Monats Tiere statistisch signifikant ( $p = 0,00002$ ) auf  $21445 \pm 2939$  BiVs/mm<sup>3</sup> absinkt (**Diagramm 4; Tabelle 8A; Tabelle 9A; Abbildung 8**). Im Vergleich der einzelnen Zeitgruppen mit der jeweils chronologisch vorausgehenden sind jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen. Jedoch bestehen statistisch signifikante Unterschiede zwischen jeweils den 14-Tages und den 6-Monats, 9-Monats und 12-Monats Tieren.



**Diagramm 4: Zeitlicher Verlauf der numerischen Dichte der TH-positiven BiVs nach Injektion von 1 ng BoNT-A**

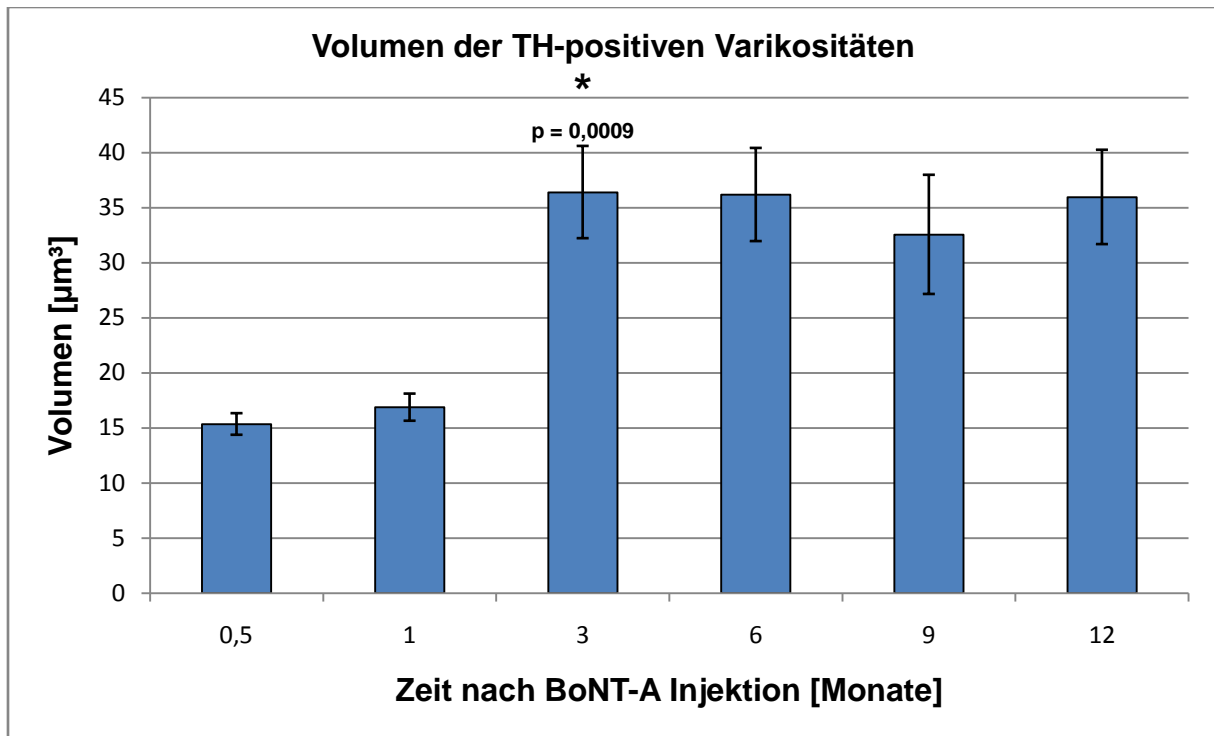
Angegeben ist die jeweilige Dichte der TH-positiven BiVs. Es zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine abnehmende Dichte. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. \* Symbolisiert einen signifikanten Unterschied im Vergleich mit den 14-Tages Tieren

### 3.4 Zeitliche Veränderungen des Volumens der TH-positiven BiVs

Bei der Auswertung der Veränderung der mittleren Volumina der TH-positiven Varikositäten im zeitlichen Verlauf wurden dieselben 34 Tiere vermessen, welche für die Bewertung der numerischen Dichte dienten.

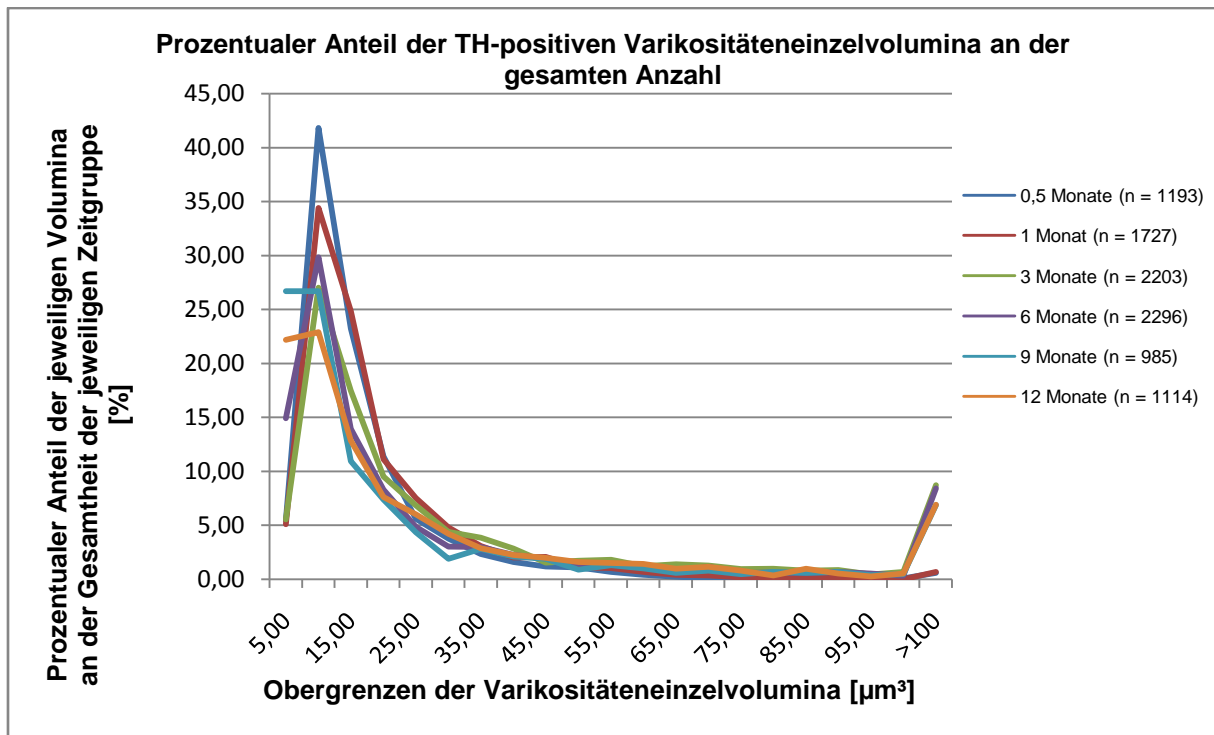
Es zeigt sich, dass bei einer intrastriatalen Injektion von 1 ng BoNT-A das mittlere Volumen der induzierten Varikositäten im beobachteten 12-Monats Verlauf insgesamt statistisch signifikant zunimmt. Im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der mittleren Varikositätenvolumina aller Zeitgruppen besteht so ein positiver Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient von  $r = 0,72$ . Hierbei liegt das mittlere Varikositätenvolumen der 14-Tages Tiere bei  $15,35 \pm 0,98 \mu\text{m}^3$  (mittleres Varikositätenvolumen  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes), welches im Falle der 12-Monats Tiere statistisch signifikant ( $p = 0,001$ ) auf  $35,97 \pm 4,28 \mu\text{m}^3$  ansteigt (**Diagramm 5; Tabelle 10A; Tabelle 11A Abbildung 8**). Hierbei unterliegt im Vergleich der einzelnen Zeitgruppen untereinander das mittlere Volumen zunächst keinen statistisch signifikanten Veränderungen, steigt dann jedoch im Vergleich der

der 1-Monats Tiere mit den 3-Monats Tieren von  $16,88 \pm 1,23 \mu\text{m}^3$  statistisch signifikant ( $p = 0,0009$ ) auf  $36,41 \pm 4,19 \mu\text{m}^3$  an. Es unterliegt in den folgenden Zeitgruppen keiner weiteren statistisch signifikanten Veränderung. Im zeitlichen Verlauf ändert sich im Vergleich mit dem mittleren Varikositätenvolumen die Anzahl großer Varikositäten nicht. So weisen alle Zeitgruppen ein Maximum des Varikositätenanteils bei  $10 \mu\text{m}^3$  auf (**Diagramm 6; Tabelle 12A**).



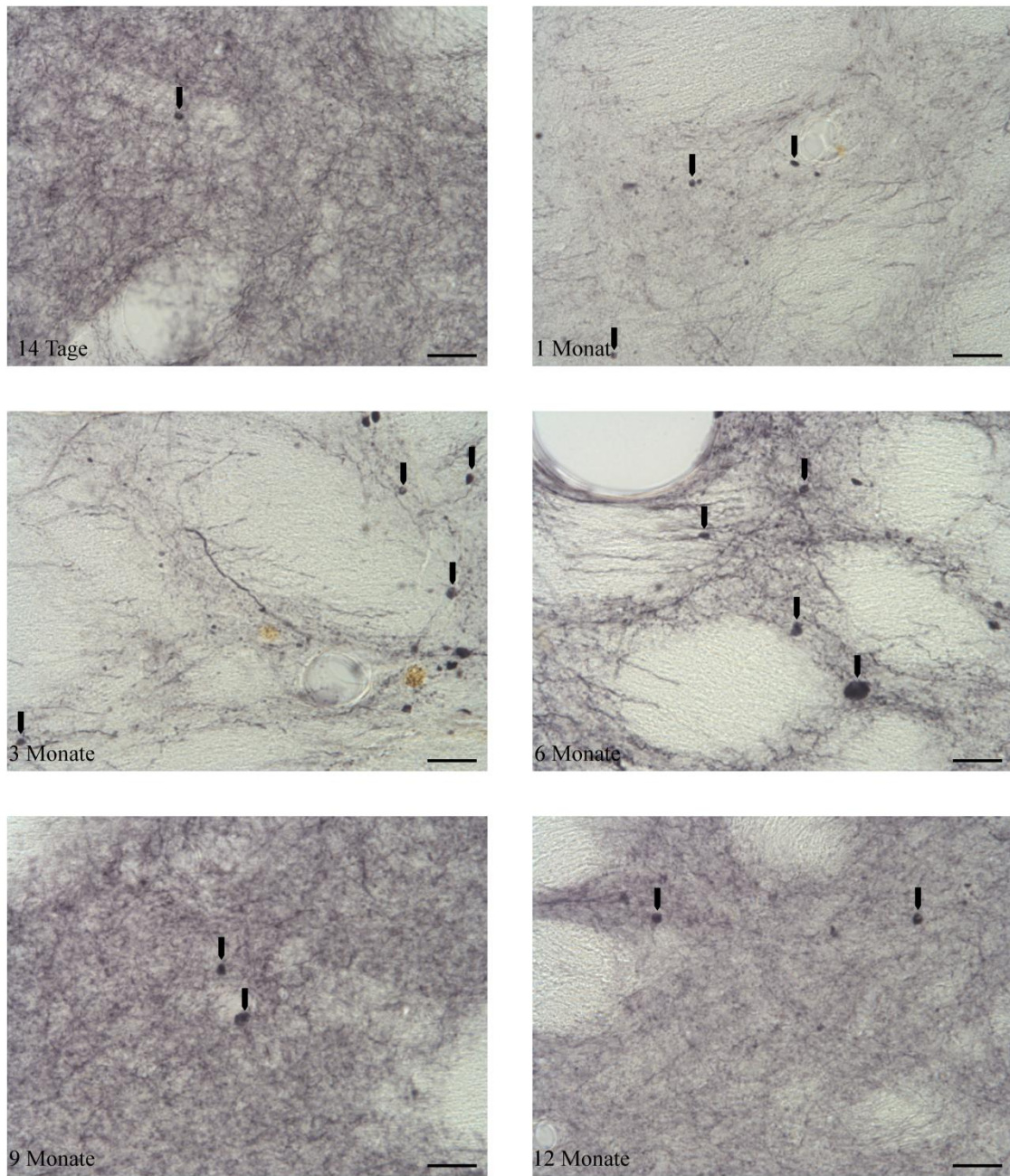
**Diagramm 5: Zeitlicher Verlauf des Volumens der TH-positiven BiVs nach Injektion von 1 ng BoNT-A**  
 Angegeben ist das jeweilige Volumen der TH-positiven BiVs. Es zeigt sich im zeitlichen Verlauf ein zunehmendes Volumen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. \* Symbolisiert einen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der vorherigen Zeitgruppe.





**Diagramm 6: Prozentualer Anteil einzelner Varikositätenvolumina an der gesamten Anzahl pro Zeitgruppe ausgemessener Varikositäten**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil, den das jeweiligen Einzelvolumen an der Gesamtheit der pro Zeitgruppe ausgemessenen Varikositäten aufweist. Die Legende zeigt neben den einzelnen Zeitgruppen diese Gesamtheit (n). Zur Erfassung des Volumens wurden Kategorien erzeugt, dessen jeweilige Obergrenzen im Diagramm dargestellt werden. So befinden sich in jeder Kategorie die Volumina zwischen und einschließlich der bezeichnenden Obergrenze und der vorhergehenden Obergrenze.



**Abbildung 8:** TH-positive Varikositäten im zeitlichen Verlauf. Dargestellt sind Bereiche aus gegen die TH gefärbten Hirnschnitten. Die Pfeile markieren TH-positive Varikositäten. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

## 4. Diskussion

### 4.1 Herkunft der Varikositäten

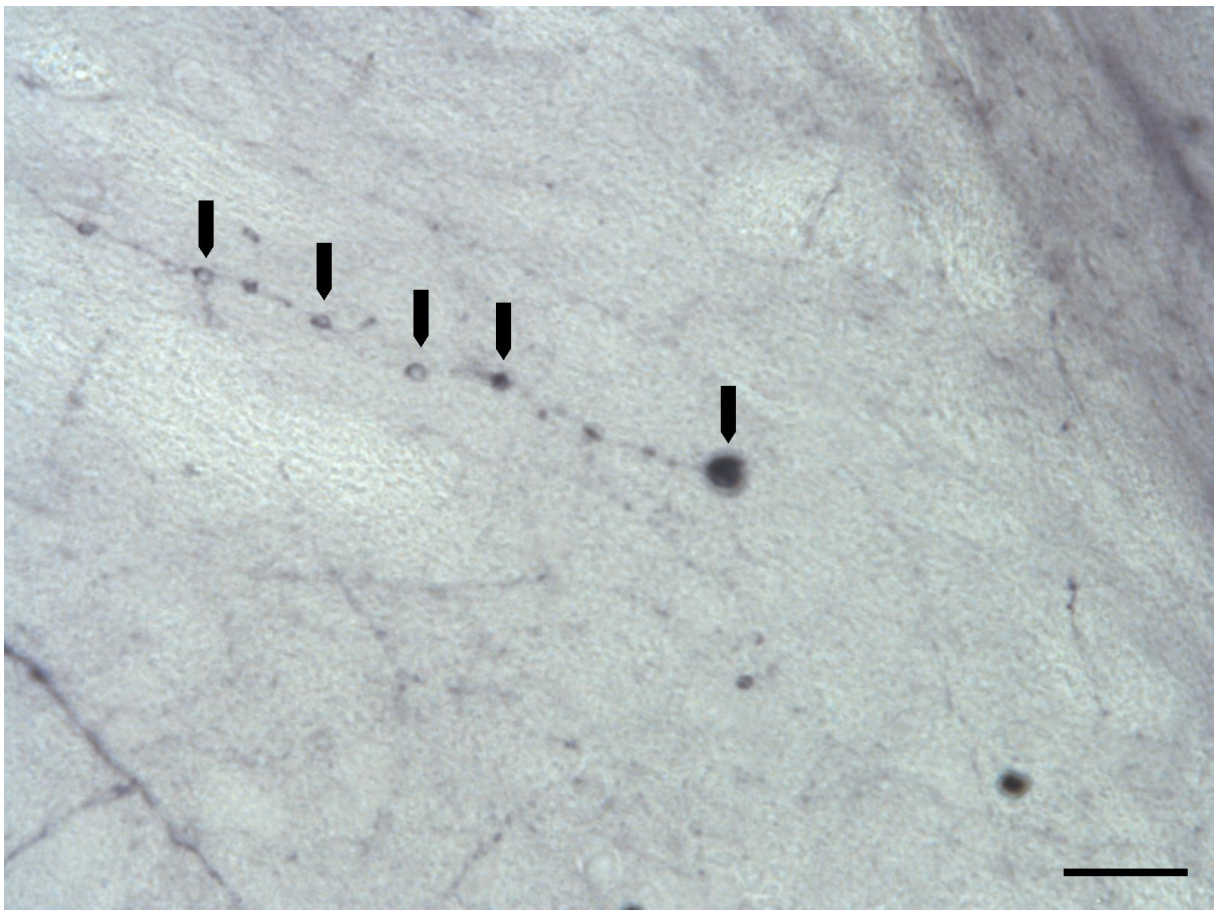
Schwellungen entlang oder am Ende von Axonen, die sich im histologischen Bild zeigen, sind keine neue Entdeckung oder keine Erscheinung, die sich nur nach Kontakt von Neuronen mit BoNT-A zeigt. Hierbei sind die Ursachen für die Ausbildung solcher Varikositäten unterschiedlichster Natur. So können sich axonale Schwellungen beispielsweise unmittelbar nach traumatischen Schäden von neuronalem Gewebe, mit zeitlichem Abstand nach einer solchen Schädigung oder auch bei der Akkumulation zellulärer Bestandteilen zeigen. Im ersten Fall treten axonale Schwellung unmittelbar, d.h. Minuten bis wenige Stunden, nach mechanischen oder hypoxischen Schädigungen von neuronalem Gewebe auf. Die mechanische Schädigung muss hierbei nicht zwingend zerstörend sein, es genügt eine Kompression von Axonen. Verantwortlich für die Entstehung von Schwellungen sind hier u.a. eine veränderte Durchlässigkeit der Membran geschädigter Neurone, ein Einstrom von Calciumionen oder das Unterbrechen von intraaxonalen Transportwegen, auf welchen gleichermaßen pro- und antiapoptotische Faktoren transportiert werden. Diese früh auftretenden Schwellungen können mit Wiederherstellung der zellulären Homöostase wieder zurücktreten oder, falls die Wiederherstellungskapazitäten der Zelle überschritten werden, im Untergang der betroffenen Neurone enden (Coleman, 2005; Hellewell et al., 2010). Im Rahmen dieses irreversiblen Endzustandes kommt es während den folgenden Tagen nach der Schädigung zu einer Aktivierung von Astrozyten, welche immunhistochemisch durch einen Anstieg der Anfärbbarkeit gegen GFAP gekennzeichnet ist. Diese Aktivität der Astrozyten und die damit verbundene immunhistochemische GFAP-Reaktivität sind im Falle hypoxischer Schäden an Axonen nach 14 Tagen besonders ausgeprägt (Coleman, 2005; Hellewell et al., 2010). Ähnliche Resultate wurden nach experimenteller, elektrischer Schädigung am Tractus corticospinalis von Versuchsratten erzielt. Hierbei wurde gezeigt, dass auch nach 13 Wochen noch ein Anstieg der GFAP-Aktivität zu beobachten ist und sich um diesen Zeitpunkt im Bereich der Schädigung eine, mit Makrophagen und Astrozyten durchsetzte, Gliazarbe gebildet hat. Auch zeigten sich um die Schädigung herum zahlreiche regenerierende Axone. Diese zeigten ein ungebremstes Wachstum um die Läsion herum, waren jedoch nicht in der Lage diese direkt zu überwachsen. Hierbei bildeten Axone, die direkt auf die Läsion zuwachsen, in der direkten Umgebung der Schädigung Varikositäten aus (Li und Raisman, 1995). Diese Schwellungen werden auch als „Retraction bulbs“ bezeichnet, welche sich stets

aus Axonen im Bereich einer Glianarbe bilden, deren Regenerationsprozess dort scheitert. Derartige Narben dienen v.a. dem Schutz des Nervengewebes vor weiteren Schäden und dichten in diesem Zusammenhang u.a. Schäden an der Blut-Hirn-Schranke ab. Die im Bereich dieser Narben entstehenden Schwellungen können von kleineren, kugelförmigen Gebilden bis zu größeren Vesikeln eine Vielzahl von Formen annehmen und auch perlschnur- oder tandemartig entlang von Axonen aufeinander folgen. Sie sind auch 13 Wochen nach der Schädigung noch anzutreffen, zeigen sich jedoch stets nur im Bereich der Läsion (Coleman, 2005; Silver und Miller, 2004). Die Experimente von Houle und Jin (2001) mit Läsionen am Rückenmark von Versuchsratten zeigten, dass sich dieser Bereich maximal in einem Radius von 1000  $\mu\text{m}$  um die Läsion herum erstreckt und sich der Großteil der „Retraction bulbs“ in einem Bereich von 500 – 750  $\mu\text{m}$  um die Läsion herum anfinden. Verantwortlich für die Entstehung dieser Varikositäten in zeitlichem Abstand einer Schädigung sind wachstumshemmende Stoffe, die im Bereich von Glianarben freigesetzt werden. Hierbei handelt es sich v.a. um Chondroitinsulfat-Proteoglykane. Die Konzentration dieser Glykoproteine nimmt mit zunehmender Entfernung von der Läsion in Richtung Peripherie ab, was die Ursache für den begrenzten Bereich darstellt, in welchem die Schwellungen anzufinden sind (Tom et al., 2004). Die Arbeitsgruppe um Ertürk et al. (2007) führte weitere Untersuchungen an diesen Varikositäten durch. Hierbei zeigte sich, dass in dem von ihnen untersuchten Zeitraum innerhalb der ersten fünf Wochen nach experimenteller Läsion von Spinalnerven der Maus deren Größe zunimmt. Diese Größenzunahme scheint das Resultat eines weiterhin ablaufenden Membranverkehrs innerhalb des jeweiligen geschädigten Neurons zu sein. Die ebenfalls durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchung ergab, dass die Varikositäten aus kleineren Vesikeln und Mitochondrien bestehen und sie eine geschädigte Mikrotubulus-Architektur aufweisen.

Neben der Entstehung von axonalen Schwellungen im Rahmen von physikalischen Schädigungen sind derartige Veränderungen auch im Zusammenhang mit der Akkumulation von pathologisch veränderten Proteinen beschrieben worden. So beschrieb die Arbeitsgruppe um Fujita et al. (2010), dass eine Mutation von Genen, die für das Protein  $\beta$ -Synuclein codieren, zu einer Ausbildung von  $\beta$ -Synuclein positiven Varikositäten führt. Bei betroffenen Versuchstieren kommt es hierbei im Alter von 6 Monaten zu dieser Ausbildung, welche mit einer massiven Gliose und damit mit einem sehr starken Anstieg der GFAP-Anfärbbarkeit verbunden ist. Auch hierbei entstehen Schwellungen entlang von Axonen, die denen bei physikalischen Schädigungen gleichen.

Auch bei der intrastriatalen Injektion von BoNT-A wurden axonale Schwellungen

beschrieben, die den Namen Botulinumtoxin induzierte Varikositäten erhielten (BiVs) (Wree et al., 2011). Diese Varikositäten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Wree et al. (2011) zeigten, dass diese Varikositäten einen Durchmesser von 2 – 9 µm aufweisen und sich wie im Falle der vorliegenden Arbeit teils perlschnurartig (**Abbildung 9**) entlang von Axonen verteilen. Diese Veränderungen wurden ausschließlich im Bereich der BoNT-Injektion aufgefunden und konnten bei Kontrolltieren, welche lediglich eine Injektion der BoNT-Vehikelsubstanz erhielten, nicht nachgewiesen werden. Weiterhin waren die Varikositäten entweder immunhistochemisch gegen die ChAT oder die TH anfärbbar, wobei dies nie parallel und im letzten Fall nicht bei Deafferenzierung mittels 6-OHDA. Auch hier wurden die Varikositäten elektronenmikroskopisch untersucht und ein Aufbau aus kleineren Vesikeln und Mitochondrien festgestellt (Wree et al., 2011).



**Abbildung 9:** Perlschnurartig aufgereichte ChAT-positive Varikositäten. Die Pfeile markieren exemplarisch ChAT-positive Varikositäten. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Die vorliegende Arbeit zeigt darüber hinaus, dass sich das mittlere Volumen dieser Varikositäten vergrößert. Das Einwirken von BoNT auf Neurone scheint also axonale Schwellungen zu generieren, die den bisher beschriebenen in vielerlei Hinsicht gleichen.

Dennoch scheint der Mechanismus der Entstehung ein anderer zu sein. So zeigten andere Arbeiten, dass hier nicht die Ausbildung einer entzündlichen Glianarbe Ursache der Varikositätenbildung ist. Dies zeigt sich zum einen an einer fehlenden Volumenveränderung und ein damit ausgeschlossener Untergang von Neuronen bzw. deren Axonen, zum anderen an einer fehlenden vermehrten immunhistochemischen Anfärbbarkeit gegen GFAP und damit einhergehend das Fehlen von gesteigerter Aktivität von Astrozyten. Lediglich im direkten Umfeld des Injektionskanals zeigt sich eine leicht erhöhte GFAP-Immunreaktivität (Antipova et al., 2013). Diese kann jedoch, in Anlehnung an die Arbeit von Tom et al. (2004), nicht für die Verbreitung von ChAT-positiven Varikositäten über das gesamte ipsilaterale Striatum ursächlich sein. Auch ist der Zeitraum, in welchem die Varikositäten entstehen, bzw. deren Volumen zunimmt ein deutlich längerer. Zwar wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Hirnschnitte untersucht, die den Zustand des Striatums nach den ersten Stunden bis ersten Tagen nach der Injektion von BoNT-A beurteilbar machen, dennoch scheint im Falle der ChAT- und TH-positiven BiVs, mit einer Zunahme des mittleren Volumens über 12 Monate, die Bildung deutlich langsamer abzulaufen. Andere Experimente mit BoNT-C geben Hinweise darauf, dass BoNT über verschiedene, Apoptose auslösende Wege zur Ausbildung von perlschnurartig aufgereihten Varikositäten führt, doch auch hier geschieht dies sehr schnell und nur mit einer Veränderung des Volumens des Injektionsgebiet (Berliocchi et al., 2005).

Eine mögliche Theorie für die Entstehung der BiVs könnte eine voranschreitende Fusion einzelner synaptischer Vesikel zu größeren Varikositäten sein, da diese Vesikel aufgrund der BoNT-induzierten Störung der SNARE-Komplex-Funktion nicht mehr für die Exozytose zur Verfügung stehen. Sie könnten jedoch, anlehnend an den von Ertürk et al. (2007) beobachteten, anhaltenden Membranverkehr, weiterhin gebildet werden. Für die Akkumulation einzelner synaptischer Vesikel spricht, dass sie jeweils positiv für Schlüsselenzyme des Neurotransmitterstoffwechsels anfärbbar sind. Bemerkenswert ist hier jedoch, dass keinerlei GABA-positive Varikositäten anzufinden sind (Wree et al., 2011). Diese Fusion scheint jedoch im Vergleich zu den rasant, im Millisekunden-Bereich ablaufenden Fusionsprozessen, die regulär im Rahmen der Vesikelexozytose an synaptischen Endigungen ablaufen, sehr langsam zu sein. So finden die Volumenveränderungen der Varikositäten nicht im Bereich Millisekunden, sondern im Verlauf von Monaten statt. Im Normalfall werden Fusionsvorgänge von Biomembranen, sofern vorgesehen, durch Fusionsproteine beschleunigt, die die benötigte Energie für eine solche Fusion senken. Ein Fehlen von Fusionsproteinen, d.h. ein proteinunabhängiger Mechanismus der Membranfusion

könnte den langsamen Ablauf erklären. Für eine solche Membranfusion ist ein sehr enger Kontakt beider Membranen unerlässlich. Dieser wird jedoch durch die physikalischen Wechselwirkungen von in Biomembranen befindlichen Membranproteinen verhindert. Diese Proteine verhindern gar, dass die Größe synaptischer Vesikel Schwankungen unterliegt, da v.a. übermäßig große Vesikel mit einem Funktionsverlust der Synapse einher gehen. Die Membranproteine müssten auseinanderrücken, um einen direkten Kontakt beider Biomembranen zu ermöglichen. Sie sind jedoch durch das verankernde Actin-Netzwerk der Zelle in ihrer Mobilität sehr stark eingeschränkt (Chernomordik et al., 2006; Shimizu et al., 2003; Zimmerberg und Chernomordik, 1999). Die Arbeitsgruppe um Berliocchi et al. (2005) zeigte hier jedoch einen interessanten Effekt von BoNT-C auf Nervengewebe auf. So scheint es zu einer Störung des zellulären Cytoskeletts, v.a. des Actin-Netzwerkes zu führen. Sollte BoNT-A einen vergleichbaren Effekt auf das Cytoskelett haben, so könnte dies in letzter Instanz das Auseinanderrücken zweier Vesikelmembranen und somit deren Fusion ermöglichen.

Hierbei handelt es sich jedoch lediglich um hypothetische Gedanken, es müssten sich hier weitere Untersuchungen wie elektronenmikroskopische Begutachtungen mehrerer Varikositäten aller Zeitgruppen und elektrophysiologische Tests anschließen. Erstere könnte möglicherweise dazu dienen, die Fusion einzelner synaptischer Vesikel direkt zu sehen. Letztere könnten beim Auffinden nicht mehr funktionstüchtiger Synapsen darauf hindeuten, dass es sich tatsächlich um übermäßig angeschwollene synaptische Vesikel handelt. Bisher lässt sich aufgrund der vorliegenden Daten einzig das Auftreten der BiVs als Folge einer Glianarbenbildung oder entzündlicher Prozesse ausschließen.

## **4.2 ChAT- und TH-positive Varikositäten und ihr unterschiedliches Verteilungsmuster**

Neben den ChAT-positiven Varikositäten lassen sich im Striatum auch TH-positive BiVs beobachten. Beiden unterschiedlichen Typen von Varikositäten ist u.a. gemeinsam, dass sie nicht im Bereich des Neocortex, des Hippocampus und im Bereich der kontralateral zur BoNT-A-Injektion gelegenen Hemisphäre nachweisbar sind. Sie unterscheiden sich jedoch, neben ihrer immunhistochemischen Anfärbbarkeit, in ihrer Verteilung. So verteilen sich ChAT-positive BiVs über den Bereich des gesamten ipsilateralen Striatums, wohingegen TH-positive BiVs vornehmlich auf den Bereich unmittelbar um den Injektionskanal herum

beschränkt bleiben.

Das Phänomen, dass im Bereich des Neokortex und des Hippocampus keinerlei Varikositäten anzutreffen sind, könnte sich mit der Art und Weise, wie BoNT-A in die jeweiligen Neurone aufgenommen wird, erklären lassen.

BoNT-A nutzt das synaptische Vesikelprotein 2 (SV2) als Rezeptor, um endozytotisch in Neurone aufgenommen zu werden. Hierbei existieren drei verschiedene Subtypen des SV2, von denen durch BoNT-A v.a. das SV2C genutzt wird (Mahrhold et al., 2006). Während die ersten beiden Subtypen, SV2A und SV2B, in vielen Bereichen des zentralen Nervensystems anzufinden sind, zeigt sich SV2C nur in einigen wenigen Bereichen. Janz und Südhof (1999) nutzten einen gegen SV2C gerichteten Antikörper zur immunhistochemischen Färbung, um diese Bereiche genauer darzustellen. Es zeigte sich, dass sich, unter Verwendung dieses Antikörpers, v.a. die Basalganglien, die Pons, die Medulla oblongata und der Bulbus olfactorius gut anfärben lassen, d.h. eine hohes Maß an SV2C aufweisen. Demgegenüber konnten keinerlei SV2C-positiven Regionen im Neocortex, im Hippocampus und nur eine sehr geringe Anfärbbarkeit im Kleinhirn, welche sich hier lediglich auf punktuelle Anfärbungen im Bereich der Körnerzellschicht beschränken, nachgewiesen werden. In diesen Gebieten fehlen entsprechend synaptische Vesikel, die SV2C tragen, was eine Erklärung für das Fehlen von BiVs in diesen Regionen darstellen könnte, da BoNT-A hier nicht in die Neurone aufgenommen werden kann und so nicht für deren Bildung zur Verfügung steht. Im Bereich der Basalganglien zeigt sich die höchste SV2C-Dichte im Pallidum, aber auch das Putamen und die Substantia nigra weisen noch eine gute Anfärbbarkeit gegen SV2C auf. Hierbei sind es im Striatum v.a. die Interneurone, die eine hohe Dichte an SV2C aufweisen, auch wenn dies bei weitem nicht bei allen Interneuronen der Fall ist (Dardou et al., 2011). Darüber hinaus zeigte die Arbeit von Janz und Südhof (1999), dass aufgrund der verschiedenen positiv anfärbaren Regionen, ein Besatz mit SV2C nicht alleine für cholinerge Neurone typisch ist. Tatsächlich weisen auch dopaminerge Fasern SV2C auf. Lediglich bei GABAergen Strukturen lässt sich keine SV2C-positiv Anfärbbarkeit beobachten. Das Vorliegen von BoNT-A-bindendem SV2C bei cholinergen und dopaminergen Neuronen, sowie das Fehlen von diesem bei GABAergen Fasern könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, warum sich sowohl ChAT- als auch TH-positive BiVs beobachtet werden ließen. Gleichermäßen erklärt dies, warum keine Varikositäten innerhalb GABAerger Strukturen nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus verdeutlicht das Vorliegen striataler BiVs in Kombination mit dem SV2C-Verteilungsmuster und dem Fehlen von Varikositäten des GABAergen Systems, dass eindeutig BoNT-A als Ursache für die Entstehung der BiVs zu



sehen ist.

Die unterschiedlichen Verteilungsmuster von ChAT- und TH-positiven Varikositäten ließen sich mit der dosisabhängigen Wirksamkeit von BoNT-A auf verschiedene Transmittersysteme erklären. Hiernach beeinflusst BoNT-A v.a. das cholinerge System, ist aber bei höheren Konzentrationen auch in der Lage andere Transmittersysteme zu beeinflussen (Bigalke et al., 1985). In diesem Falle würde es sich bei den anderen Systemen um die dopaminergen Fasern handeln. Die für diese Arbeit verwendete Dosis von 1 ng BoNT-A scheint demnach dazu in der Lage zu sein, im gesamten Striatum ChAT-positive BiVs hervorzurufen. Da die Dosis jedoch mit zunehmender Entfernung vom Injektionsort abnimmt, könnte sie weiter entfernt vom Injektionskanal nicht mehr für die Bildung TH-positiver BiVs ausreichen.

### **4.3 Veränderung der numerischen Dichte und der mittleren Volumina der BiVs**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die numerische Dichte der Varikositäten im zeitlichen Verlauf abnimmt und zwischen den 14-Tages und 12-Monats Tieren beider Transmittersysteme diesbezüglich ein statistisch signifikanter Unterschied besteht. Im Falle der TH-positiven Varikositäten unterscheidet sich deren Dichte ab den 6-Monats Tieren, statistisch signifikant von der numerischen Dichte der 14-Tages Tiere. Die Arbeitsgruppe um Gasior et al. (2013) zeigte im Tierversuch, dass BoNT-A eine zentrale, durch den Apomorphinrotationstest bei 6-OHDA-hemiläsionierten Ratten beurteilbare Wirksamkeit von bis zu drei Monaten aufweist, wonach dessen Wirkung nachließ. Betrachtet man die Varikositäten als Produkt der BoNT-Injektion, so könnte die statistisch signifikante Abnahme der numerischen Varikositätendichte der TH-positiven BiVs bei den nach den 3-Monats Tieren folgenden Zeitgruppen als Folge der nachlassenden BoNT-Wirkung interpretiert werden.

Ähnlich verhält es sich mit der Entwicklung der numerischen Dichte der ChAT-positiven Varikositäten, mit dem Unterschied, dass hier die numerische Dichte im Verlauf der ersten drei Monate zunächst ansteigt. Da sich diese Veränderungen im Zeitraum der von Gasior et al. (2013) beschrieben, zentralen Wirkdauer abspielen, ließe sich der initiale Anstieg der numerischen Dichte als Effekt der zentralen BoNT-Wirkung interpretieren. Mit Nachlassen der Wirkung der BoNT-Injektion jenseits von drei Monaten nimmt auch bei den ChAT-positiven Varikositäten die numerische Dichte im zeitlichen Verlauf ab. Der initiale Anstieg

der numerischen Dichte im Falle der ChAT-positiven Varikositäten, als Unterschied zu den TH-positiven Varikositäten, lässt sich mit der dosisabhängigen Wirksamkeit von BoNT-A auf die beiden verschiedenen Transmittersysteme (Bigalke et al., 1985) erklären. Diese könnte neben dem unterschiedlichen Verteilungsmuster auch für den fehlenden Anstieg der numerischen Dichte der TH-positiven Varikositäten im Verlauf der ersten drei Monate verantwortlich sein. Interessant zu sehen wäre hier, ob eine erhöhte BoNT-A Dosis auch im Falle der TH-positiven Varikositäten zunächst zu einem Anstieg der numerischen Varikositätendichte führen würde.

Neben der Veränderung der numerischen Dichte der Varikositäten im zeitlichen Verlauf, konnte ebenfalls eine Zunahme der mittleren Varikositätenvolumina beobachtet werden. Im Falle der TH-positiven Varikositäten zeigt sich eine Zunahme der mittleren Volumina. Diese ist zwar im Vergleich direkt aufeinander folgender Zeitgruppen nicht statistisch signifikant, im Hinblick auf den Vergleich der 14-Tages Tiere mit den 12-Monats Tieren liegt hier jedoch eine statistisch signifikante Abnahme vor. Beim Betrachten der Anzahl bzw. dem Anteil der verschieden großen Varikositäten an der Gesamtheit der vermessenen Varikositäten jeder Zeitgruppe fällt jedoch auf, dass alle Zeitgruppen ein Maximum des Varikositätenanteils bei ungefähr  $10 \mu\text{m}^3$  aufweisen. Demnach kommt es hier nicht zu einer Zunahme des Volumens einzelner Varikositäten im zeitlichen Verlauf. Vielmehr könnte die Zunahme der mittleren Varikositätenvolumina als statistischer Effekt in Folge der Abnahme der numerischen Varikositätendichte anzusehen sein. Diese würde zunächst kleine Volumina betreffen und so folglich zu einer relativen Zunahme der mittleren Varikositätenvolumina führen.

Auch das mittlere Volumen der ChAT-positiven Varikositäten nimmt im zeitlichen Verlauf statistisch signifikant zu. Diese Zunahme ist jedoch nicht nur in Bezug auf den zeitlichen Anfangs- und Endpunkt statistisch signifikant, sondern auch jeweils zwischen den 1-Monats, 3-Monats, 6-Monats und 9-Monats Tieren. Ferner weisen, bei der Betrachtung der Anteile der verschieden großen Varikositäten an der Gesamtheit der ausgemessenen Varikositäten, die verschiedenen Zeitgruppen unterschiedliche Maxima bezüglich der Varikositätenanteile auf. So kann beobachtet werden, dass es zu einer Zunahme der Volumina einzelner Varikositäten im zeitlichen Verlauf kommt. Diese Zunahme der Varikositätenvolumina könnte, anlehnend an die Entstehung einzelner Varikositäten, durch die Fusion einzelner kleiner zu weniger größeren Varikositäten erklärt werden.

## 4.4 Ausblick

Von besonderer Bedeutung für die therapeutische Nutzung von BoNT-A im Rahmen der Parkinson-Erkrankung ist die Tatsache, dass dieses Neurotoxin einen Rezeptor für die endozytotische Aufnahme nutzt, der weitestgehend nur in den Zielstrukturen anzutreffen ist, v.a. im Bereich des Striatums. Der Wirkungsbereich von BoNT-A zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit sehr gut anhand der Verteilung der BiVs. Dieser Wirkungsbereich ist dahingehend von Bedeutung, als dass dieses höchst potente Toxin auf diese Art nur dort seine Wirkung entfaltet, wo dies im therapeutischen Zusammenhang mit der Parkinson-Erkrankung auch erwünscht ist und nicht in striatumfernen Regionen andere Hirnfunktionen stört. Dennoch spielt das Striatum, neben der Funktion im Rahmen der Motorik, eine wichtige Rolle bei affektiven und kognitiven Prozessen. So zeigen mit BoNT behandelte Ratten im Tierversuch ein reduziertes Angstverhalten. Dieser Effekt könnte sich jedoch positiv auf die depressiven Symptome der Parkinson-Erkrankung auswirken (Holzmann et al., 2012).

Ferner legt das Auftreten auch TH-positiver Varikositäten nahe, dass die Dosis des verabreichten BoNT-A möglicherweise reduziert werden könnte, um so nur die cholinergen Interneurone in ihrer Überaktivität zu bremsen. Diese Arbeit zeigt anhand der über Monate hinweg bestehenden Varikositäten des Weiteren, dass BoNT-A bei intrastriatarer Injektion, eine lang anhaltende Wirkung aufweist. BoNT-A könnte so eine langwirkende und nebenwirkungsarme Therapie einer Erkrankung darstellen, welche in der Zukunft noch an Bedeutung zunehmen wird. Die bisherige Therapie der Parkinsonerkrankung stellt aufgrund der im Verlauf auftretenden Nebenwirkungen, des strikten Zeitintervalls und der großen Menge an einzunehmenden Medikamenten, neben dem ohnehin krankheitsbedingten, einschränkenden Beschwerden, eine Belastung für die Patienten dar, welche BoNT-A vielleicht minimieren könnte.

## 5. Anhang

### 5.1 Tabellenanhang

Tiere	Gesamt ausgewertete Fläche ( $\mu\text{m}^2$ )	Gesamt ausgewertetes Volumen ( $\mu\text{m}^3$ )	BiVs / $\text{mm}^3$	Durchschnittliches Varikositätensvolumen ( $\mu\text{m}^3$ )
<i>14 Tage</i>				
<b>Bo 337</b>	40934300	8596200000	12881	20,12
<b>Bo 343</b>	53917400	11322700000	11841	17,24
<b>Bo 316</b>	49433900	10381100000	10733	14,98
<b>Bo 332</b>	49248800	10342200000	11056	24,39
<b>Bo 335</b>	49395500	10373100000	10563	18,43
<b>Bo 338</b>	27188100	5709500000	12419	18,59
<i>1 Monat</i>				
<b>Bo 345</b>	46758100	9819200000	14053	17,49
<b>Bo 330</b>	52430100	11010300000	19810	19,78
<b>Bo 308</b>	41530900	8721500000	15336	27,15
<b>Bo 333</b>	50045900	10509600000	9867	17,30
<i>3 Monate</i>				
<b>Bo 339</b>	41408900	8695870000	17809	28,77
<b>Bo 304</b>	58835300	12355400000	13201	25,58
<b>Bo 305</b>	60982300	12806300000	13248	32,09
<b>Bo 312</b>	56005400	11761100000	13557	39,55
<i>6 Monate</i>				
<b>Bo 322</b>	49459800	10386500000	12214	43,09
<b>Bo 321</b>	49997100	10499400000	13102	41,60
<b>Bo 328</b>	57060900	11982800000	10202	35,77
<b>Bo 318</b>	53466600	11228000000	12364	39,46
<b>Bo 336</b>	34113500	7163830000	16040	35,26
<b>Bo 341</b>	49025600	10295400000	12938	35,95
<i>9 Monate</i>				
<b>Bo 311</b>	49084000	10307600000	9168	39,93
<b>Bo 323</b>	40027100	8405690000	9570	44,95
<b>Bo 324</b>	52842800	11097000000	7851	38,97
<b>Bo 334</b>	53639300	11264300000	7908	50,62
<b>Bo 325</b>	56780500	11923900000	9100	55,10
<b>Bo 344</b>	58987200	12387300000	7094	51,79
<i>12 Monate</i>				
<b>Bo 303</b>	40197600	8441490000	8976	41,64
<b>Bo 306</b>	44426400	9329540000	7226	54,55
<b>Bo 307</b>	63412200	13316600000	10601	54,25
<b>Bo 317</b>	46971700	9864050000	8420	54,82
<b>Bo 342</b>	36874100	7743560000	10203	52,19

Tabelle 1A: Rohdaten der jeweiligen Tiere - ChAT

<b>Tiere</b>	<b>Gesamt ausgewertete Fläche (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>Gesamt ausgewertetes Volumen (µm<sup>3</sup>)</b>	<b>BiVs / mm<sup>3</sup></b>	<b>Durchschnittliches Varikositätenvolumen (µm<sup>3</sup>)</b>
<i>14 Tage</i>				
<b>Bo 337</b>	817382	171650000	47906	16,21
<b>Bo 343</b>	909427	190980000	51780	12,72
<b>Bo 316</b>	729818	153262000	46391	13,96
<b>Bo 332</b>	654388	137421000	51149	14,20
<b>Bo 335</b>	905275	190108000	38036	19,58
<b>Bo 338</b>	758322	159248000	47486	15,44
<i>1 Monat</i>				
<b>Bo 345</b>	1526330	320529000	39148	14,89
<b>Bo 319</b>	1199140	251820000	42646	15,89
<b>Bo 330</b>	1347890	283058000	59970	18,24
<b>Bo 308</b>	1439000	302190000	34412	22,33
<b>Bo 314</b>	991908	208301000	31474	15,87
<b>Bo 333</b>	1139120	239214000	45123	14,05
<i>3 Monate</i>				
<b>Bo 302</b>	2319330	487058000	35330	36,20
<b>Bo 339</b>	2820840	592376000	44080	31,34
<b>Bo 304</b>	1660930	348796000	34109	26,57
<b>Bo 305</b>	1835030	385356000	59747	51,51
<b>Bo 312</b>	1127640	236805000	36397	36,42
<i>6 Monate</i>				
<b>Bo 322</b>	2448200	514122000	39401	32,65
<b>Bo 321</b>	1735580	364473000	26180	46,99
<b>Bo 328</b>	2020830	424374000	45281	44,33
<b>Bo 309</b>	1510420	317188000	22548	23,13
<b>Bo 318</b>	3963140	832259000	31812	44,17
<b>Bo 341</b>	1134300	238202000	32498	25,85
<i>9 Monate</i>				
<b>Bo 311</b>	1713140	359759000	19127	35,65
<b>Bo 323</b>	1594880	334926000	21414	47,66
<b>Bo 334</b>	2192070	460334000	24728	26,35
<b>Bo 324</b>	1193850	250709000	49898	37,49
<b>Bo 325</b>	1035880	217534000	26281	15,68
<i>12 Monate</i>				
<b>Bo 303</b>	2239010	470191000	29505	25,69
<b>Bo 306</b>	2172230	456169000	14679	62,19
<b>Bo 317</b>	1682360	353295000	20312	37,52
<b>Bo 342</b>	1427960	299871000	23260	34,63
<b>Bo 307</b>	1254500	263445000	25349	31,61
<b>Bo 310</b>	1225360	257325000	33790	23,26

**Tabelle 2A:** Rohdaten der jeweiligen Tiere – TH

<b>Zeitgruppe</b>	<b>Mittelwerte der Varikositätendichte (BiVs/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Standardfehler des Mittelwertes</b>
14 Tage	11582	387
1 Monat	14767	2047
3 Monate	14459	1120
6 Monate	12810	772
9 Monate	8449	395
12 Monate	9085	611

**Tabelle 3A:** numerische Dichte der ChAT-positiven Varikositäten

	<b>1 Monat</b>	<b>3 Monate</b>	<b>6 Monate</b>	<b>9 Monate</b>	<b>12 Monate</b>
<b>P (14 Tage)</b>	0,096098	0,021432	0,185589	0,000208	0,005942
<b>P (1 Monat)</b>		0,899374	0,329466	0,005752	0,021437
<b>P (3 Monate)</b>			0,243604	0,000350	0,002911
<b>P (6 Monate)</b>				0,000516	0,005192
<b>P (9 Monate)</b>					0,388914

**Tabelle 4A:** Student's T-Test (p-Werte) – Dichte der ChAT-positiven Varikositäten; Angegeben sind die p-Werte der in der horizontalen Titelspalte geführten Zeitgruppen im Vergleich mit den in Klammern geführten Zeitgruppen der vertikalen linken Spalte

<b>Zeitgruppe</b>	<b>Mittelwerte der Varikositätenvolumina (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	<b>Standardfehler des Mittelwertes</b>
<b>14 Tage</b>	18,96	1,29
<b>1 Monat</b>	20,43	2,31
<b>3 Monate</b>	31,50	3,00
<b>6 Monate</b>	38,52	1,37
<b>9 Monate</b>	46,89	2,71
<b>12 Monate</b>	51,49	2,51

**Tabelle 5A:** Volumen der ChAT-positiven Varikositäten

	<b>1 Monat</b>	<b>3 Monate</b>	<b>6 Monate</b>	<b>9 Monate</b>	<b>12 Monate</b>
<b>P (14 Tage)</b>	0,563260	0,002369	0,000001	0,000003	0,000001
<b>P (1 Monat)</b>		0,026438	0,000089	0,000128	0,000046
<b>P (3 Monate)</b>			0,042790	0,005833	0,001305
<b>P (6 Monate)</b>				0,020201	0,001018
<b>P (9 Monate)</b>					0,251670

**Tabelle 6A:** Student's T-Test (p-Werte) – Volumen der ChAT-positiven Varikositäten; Angegeben sind die p-Werte der in der horizontalen Titelspalte geführten Zeitgruppen im Vergleich mit den in Klammern geführten Zeitgruppen der vertikalen linken Spalte

Obergrenze der jeweiligen Volumenkategorie [ $\mu\text{m}^3$ ]	14 Tage	1 Monat	3 Monate	6 Monate	9 Monate	12 Monate
5	0,60	0,60	0	0	0	0
10	17,02	14,09	2,30	0,27	0,19	0
15	32,41	25,43	14,12	4,16	2,00	1,90
20	19,96	23,70	21,18	11,52	7,50	6,49
25	11,96	13,07	19,10	15,27	11,31	11,39
30	5,66	7,58	12,15	14,72	14,22	15,03
35	3,64	4,90	8,26	12,21	13,57	13,53
40	2,72	2,75	5,36	11,16	9,76	9,57
45	1,85	2,27	4,11	7,86	7,82	7,20
50	1,09	1,73	1,97	4,85	5,82	4,59
55	0,71	1,08	2,30	3,48	4,91	5,22
60	0,60	0,66	1,64	2,70	4,27	2,61
65	0,22	0,60	0,93	2,42	2,46	2,61
70	0,27	0,30	1,31	1,37	2,39	2,22
75	0,22	0,06	0,60	1,37	2,20	2,45
80	0,05	0,12	0,55	1,00	1,68	2,14
85	0,16	0,48	0,55	1,05	1,23	1,66
90	0,11	0,30	0,38	0,64	1,10	0,87
95	0,11	0	0,49	0,32	0,90	1,11
100	0,05	0,06	0,22	0,46	0,45	0,79
>100	0,60	0,24	2,46	3,20	6,21	8,62

**Tabelle 7A:** prozentuale Anteile der einzelnen Volumina an der pro Zeitgruppe ausgewerteten ChAT-positiven Varikositätengesamtheit

Zeitgruppe	Mittelwerte der Varikositätendichte (BiVs/ $\text{mm}^3$ )	Standardfehler des Mittelwertes
14 Tage	47125	2015
1 Monat	42129	4121
3 Monate	41933	4782
6 Monate	32953	3412
9 Monate	28290	5545
12 Monate	21445	2939

**Tabelle 8A:** numerische Dichte der TH-positiven Varikositäten



	<b>1 Monat</b>	<b>3 Monate</b>	<b>6 Monate</b>	<b>9 Monate</b>	<b>12 Monate</b>
<b>P (14 Tage)</b>	0,3016594	0,31295546	0,00503928	0,00741158	0,0000221
<b>P (1 Monat)</b>		0,97574019	0,11710768	0,07121446	0,001210417
<b>P (3 Monate)</b>			0,15170436	0,09943317	0,002539514
<b>P (6 Monate)</b>				0,47576105	0,025101429
<b>P (9 Monate)</b>					0,254829342

**Tabelle 9A:** Student's T-Test (p-Werte) – Dichte der TH-positiven Varikositäten; Angegeben sind die p-Werte der in der horizontalen Titelspalte geführten Zeitgruppen im Vergleich mit den in Klammern geführten Zeitgruppen der vertikalen linken Spalte

<b>Zeitgruppe</b>	<b>Mittelwerte der Varikositätenvolumina (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	<b>Standardfehler des Mittelwertes</b>
<b>14 Tage</b>	15,35	0,98
<b>1 Monat</b>	16,88	1,23
<b>3 Monate</b>	36,41	4,19
<b>6 Monate</b>	36,19	4,23
<b>9 Monate</b>	32,57	5,41
<b>12 Monate</b>	35,97	4,28

**Tabelle 10A:** Volumen der TH-positiven Varikositäten

	<b>1 Monat</b>	<b>3 Monate</b>	<b>6 Monate</b>	<b>9 Monate</b>	<b>12 Monate</b>
<b>P (14 Tage)</b>	0,3552066	0,00045991	0,00072475	0,0073718	0,00155631
<b>P (1 Monat)</b>		0,00089559	0,00137068	0,01283278	0,002830662
<b>P (3 Monate)</b>			0,97116677	0,58965094	0,945892119
<b>P (6 Monate)</b>				0,60531212	0,972174477
<b>P (9 Monate)</b>					0,631940885

**Tabelle 11A:** Student's T-Test (p-Werte) – Volumen der TH-positiven Varikositäten; Angegeben sind die p-Werte der in der horizontalen Titelspalte geführten Zeitgruppen im Vergleich mit den in Klammern geführten Zeitgruppen der vertikalen linken Spalte

Obergrenze der jeweiligen Volumenkategorie [ $\mu\text{m}^3$ ]	14 Tage	1 Monat	3 Monate	6 Monate	9 Monate	12 Monate
5	5,45	5,10	5,54	14,94	26,70	22,17
10	41,83	34,39	27,01	29,83	26,70	22,89
15	23,22	24,84	17,48	13,94	10,96	12,84
20	11,40	11,12	9,53	8,32	7,41	7,63
25	5,62	7,53	6,85	4,88	4,37	6,01
30	3,77	4,81	4,40	3,05	1,93	4,22
35	2,35	3,07	3,86	3,01	2,84	2,87
40	1,59	2,03	2,86	2,26	2,13	2,24
45	1,17	2,08	1,54	1,96	1,93	1,97
50	1,09	1,10	1,72	1,48	0,91	1,62
55	0,67	1,04	1,82	1,35	1,32	1,53
60	0,42	0,69	1,23	1,13	1,02	1,44
65	0,25	0,41	1,41	0,74	0,61	0,99
70	0,08	0,35	1,27	1,18	0,81	1,17
75	0,25	0,17	0,95	0,61	0,51	0,81
80	0,00	0,17	1,00	0,65	0,71	0,36
85	0,00	0,17	0,82	0,61	0,61	0,99
90	0,17	0,12	0,86	0,70	0,71	0,54
95	0,00	0,12	0,45	0,57	0,41	0,27
100	0,08	0,00	0,68	0,35	0,51	0,54
>100	0,59	0,69	8,72	8,45	6,90	6,91

**Tabelle 12A:** prozentuale Anteile der einzelnen Volumina an der pro Zeitgruppe ausgewerteten TH-positiven Varikositätengesamtheit

Material	Hersteller
<b>Cryostat Jung CM300</b>	Leica, Bensheim/ Jung , Deutschland
<b>Deckgläser Menzel Gläser 24 mm x 60 mm</b>	in vitro diagnostic/ Apothekecharge
<b>Digital ansteuerbarer Objektträgertisch, MT12</b>	Heidenhain, Traunreut, Deutschland
<b>Digitalkamera CX9000 für Durchlichtmikroskopie</b>	MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA
<b>Hamilton-Mikroliterspritze</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Mikroskop BX 51</b>	Olympus, Tokyo, Japan
<b>Objektträger Menzel-Gläser Superfrost® Plus</b>	Thermo Scientific
<b>Pinsel Junior Synthetics, Serie 303, Größe 1 und 2</b>	da Vinci
<b>Schüttler Standard Analog Shaker</b>	VWR, Darmstadt
<b>Stereotaktischer Apparat</b>	David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA
<b>24-Well- und 48-Well-Gewebekulturschalen Multidish</b>	Greiner bio-one

**Tabelle 13A:** Materialien und Hersteller

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>ABC Elite Kits Anti goat, Anti mouse, standard (biotynlierter Sekundärantikörper, Avidin, Biotin)</b>	Vector Laboratories, Camon, Wiesbaden, Deutschland
<b>Ammoniumchlorid</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Ammonium-nickelsulfat Hexahydrat</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>Botulinumtoxin-A</b>	Quadragech Diagnostics
<b>DePeX</b>	Serva, Heidelberg, Deutschland
<b>Diaminobenzidin</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>Ethylenglykol 99%</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Glycerol 85%</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Normal Rabbit Serum</b>	Vector Laboratories, Southfield, MI, USA
<b>Propanol</b>	Apothekencharge
<b>Rinderserumalbumin Albumin Fraktion V</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Saccharose</b>	Handelsüblicher Zucker
<b>Tissue Freezing Medium©</b>	Tissue Freezing Medium©
<b>Triton X-100</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>Xylazin (Rompun©)</b>	Bayer, Deutschland
<b>Xylol</b>	J T Baker, Greisheim, Deutschland

**Tabelle 14A:** Chemikalien und Hersteller

<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>ChAT (Ziege)</b>	1:200	Chemicon (Millipore)
<b>TH (Maus)</b>	1:1000	Sigma-Aldrich

**Tabelle 15A:** Primäre Antikörper und Hersteller

<b>Sekundärer Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Anti-Ziege (Kaninchen)</b>	1:67	Vector
<b>Anti-Maus (Pferd)</b>	1:67	Vector

**Tabelle 16A:** Sekundäre Antikörper und Hersteller

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Excel</b>	Microsoft
<b>Steuer- und Auswertprogramm StereoInvestigator, v8.0</b>	MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA

**Tabelle 17A:** Software und Hersteller

## 5.2 Literaturverzeichnis

Albin, R. L.; Young, A. B.; Penney, J. B. (1989): The functional anatomy of basal ganglia disorders. In: *Trends Neurosci.* 12 (10), S. 366–375.

Alvarez, B.; Radi, R. (2003): Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. In: *Amino Acids* 25 (3-4), S. 295–311.

Angot, E.; Brundin, P. (2009): Dissecting the potential molecular mechanisms underlying alpha-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease. In: *Parkinsonism Relat. Disord.* 15 Suppl 3, S. S143-147.

Antipova, V.; Hawlitschka, A.; Mix, E.; Schmitt, O.; Dräger, D.; Benecke, R.; Wree, A. (2013): Behavioral and structural effects of unilateral intrastriatal injections of botulinum neurotoxin a in the rat model of Parkinson's disease. In: *J. Neurosci. Res.* 91 (6), S. 838–847.

Antonini, A.; Tolosa, E.; Mizuno, Y.; Yamamoto, M.; Poewe, W. H. (2009): A reassessment of risks and benefits of dopamine agonists in Parkinson's disease. In: *Lancet Neurol* 8 (10), S. 929–937.

Antonucci, F.; Cerri, C.; Maya Vetencourt, J F; Caleo, M. (2010): Acute neuroprotection by the synaptic blocker botulinum neurotoxin E in a rat model of focal cerebral ischaemia. In: *Neuroscience* 169 (1), S. 395–401.

Antonucci, F.; Bozzi, Y.; Caleo, M. (2009): Intrahippocampal infusion of botulinum neurotoxin E (BoNT/E) reduces spontaneous recurrent seizures in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. In: *Epilepsia* 50 (4), S. 963–966.

- Antonucci, F.; Di Garbo, A.; Novelli, E.; Manno, I.; Sartucci, F.; Bozzi, Y.; Caleo, M. (2008): Botulinum neurotoxin E (BoNT/E) reduces CA1 neuron loss and granule cell dispersion, with no effects on chronic seizures, in a mouse model of temporal lobe epilepsy. In: *Exp. Neurol.* 210 (2), S. 388–401.
- Berliocchi, L.; Fava, E.; Leist, M.; Horvat, V.; Dinsdale, D.; Read, D.; Nicotera, P. (2005): Botulinum neurotoxin C initiates two different programs for neurite degeneration and neuronal apoptosis. In: *J. Cell Biol.* 168 (4), S.607–618.
- Bigalke, H.; Dreyer, F.; Bergey, G. (1985): Botulinum A neurotoxin inhibits non-cholinergic synaptic transmission in mouse spinal cord neurons in culture. In: *Brain Res.* 360 (1-2), S. 318–324.
- Bigalke, H.; Heller, I.; Bizzini, B.; Habermann, E. (1981): Tetanus toxin and botulinum A toxin inhibit release and uptake of various transmitters, as studied with particulate preparations from rat brain and spinal cord. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 316 (3), S. 244–251.
- Bogaert, L.; Scheller, D.; Moonen, J.; Sarre, S.; Smolders, I.; Ebinger, G.; Michotte, Y. (2000): Neurochemical changes and laser Doppler flowmetry in the endothelin-1 rat model for focal cerebral ischemia. In: *Brain Res.* 887 (2), S. 266–275.
- Bohnen, N. I.; Albin, R. L. (2011): The cholinergic system and Parkinson disease. In: *Behav. Brain Res.* 221 (2), S. 564–573.
- Borodic, G. E.; Ferrante, R.; Pearce, L. B.; Smith, K. (1994): Histologic assessment of dose-related diffusion and muscle fiber response after therapeutic botulinum A toxin injections. In: *Mov. Disord.* 9 (1), S. 31–39.

- Braak, H.; Bohl, J. R.; Müller, C. M.; Rüb, U.; de Vos, R. A I; Del Tredici, K. (2006): Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. In: *Mov. Disord.* 21 (12), S. 2042–2051.
- Braak, H.; Del Tredici, K. (2008): Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. In: *Neurology* 70 (20), S. 1916–1925.
- Braak, H.; Ghebremedhin, E.; Rüb, U.; Bratzke, H.; Del Tredici, K. (2004): Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. In: *Cell Tissue Res.* 318 (1), S. 121–134.
- Brashear, A.; Bergan, K.; Wojcieszek, J.; Siemers, E. R.; Ambrosius, W. (2000): Patients' perception of stopping or continuing treatment of cervical dystonia with botulinum toxin type A. In: *Mov. Disord.* 15 (1), S. 150–153.
- Breidenbach, M. A.; Brunger, A. T. (2004): Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A. In: *Nature* 432 (7019), S. 925–929.
- Brocks, D. R. (1999): Anticholinergic drugs used in Parkinson's disease: An overlooked class of drugs from a pharmacokinetic perspective. In: *J Pharm Sci* 2 (2), S. 39–46
- Burré, Jacqueline; Sharma, Manu; Tsetsenis, Theodoros; Buchman, Vladimir; Etherton, Mark R.; Südhof, Thomas C. (2010): Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. In: *Science* 329 (5999), S. 1663–1667.
- Calne, D. B.; Sandler, M. (1970): L-Dopa and Parkinsonism. In: *Nature* 226 (5240), S. 21–24.
- Chaddock, J. A.; Marks, P M H (2006): Clostridial neurotoxins: structure-function led design of new therapeutics. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (5), S. 540–551.

- Chaddock, J. A.; Purkiss, J. R.; Alexander, F. C G; Doward, S.; Fooks, S. J.; Friis, L. M. et al. (2004): Retargeted clostridial endopeptidases: inhibition of nociceptive neurotransmitter release in vitro, and antinociceptive activity in in vivo models of pain. In: *Mov. Disord.* 19 Suppl 8, S. S42-7.
- Chao, Y.; Gang, L.; Na, Z. L.; Ming, W. Y.; Zhong, W. S.; Mian, W. S. (2007): Surgical management of Parkinson's disease: update and review. In: *Interv Neuroradiol* 13 (4), S. 359–368.
- Chernomordik, L. V.; Zimmerberg, J.; Kozlov, M. M. (2006): Membranes of the world unite! In: *J. Cell Biol.* 175 (2), S. 201–207.
- Clarke, C. E. (2002): Medical management of Parkinson's disease. In: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 72 Suppl 1, S. I22-I27.
- Coleman, M. (2005): Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (11), S. 889–898.
- Conway, K. A.; Harper, J. D.; Lansbury, P. T. (1998): Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. In: *Nat. Med.* 4 (11), S. 1318–1320.
- Costa, J.; Espírito-Santo, C.; Borges, A.; Ferreira, J. J.; Coelho, M.; Sampaio, C. (2005): Botulinum toxin type A versus anticholinergics for cervical dystonia. In: *Cochrane Database Syst Rev* (1), S. CD004312.
- Costantin, L.; Bozzi, Y.; Richichi, C.; Viegi, A.; Antonucci, F.; Funicello, Marcella et al. (2005): Antiepileptic effects of botulinum neurotoxin E. In: *J. Neurosci.* 25 (8), S. 1943–1951.
- Critchley, E. M. (1991): Botulism. In: *Postgrad Med J* 67 (786), S. 401.

Dardou, D.; Dassel, D.; Cuvelier, L.; Deprez, T.; Ryck, M. de; Schiffmann, S. N. (2011): Distribution of SV2C mRNA and protein expression in the mouse brain with a particular emphasis on the basal ganglia system. In: *Brain Res.* 1367, S. 130–145.

Del Tredici, K.; Rüb, U.; de Vos, R. A I; Bohl, J. R E; Braak, H. (2002): Where does parkinson disease pathology begin in the brain? In: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61 (5), S. 413–426.

Dickson, D. W.; Uchikado, H.; Fujishiro, H.; Tsuboi, Y. (2010): Evidence in favor of Braak staging of Parkinson's disease. In: *Mov. Disord.* 25 Suppl 1, S. S78-82.

Dickson, E. C. (1918): Botulism. In: *Can Med Assoc J* 8 (10), S. 903–909.

Dirnagl, U.; Iadecola, C.; Moskowitz, M. A. (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. In: *Trends Neurosci.* 22 (9), S. 391–397.

Dong, M.; Liu, H.; Tepp, W. H.; Johnson, E. A.; Janz, R.; Chapman, E. R. (2008): Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons. In: *Mol. Biol. Cell* 19 (12), S. 5226–5237.

Dong, M.; Yeh, F.; Tepp, W. H.; Dean, C.; Johnson, E. A.; Janz, R.; Chapman, E. R. (2006): SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. In: *Science* 312 (5773), S. 592–596.

Dray, A.; Urban, L.; Dickenson, A. (1994): Pharmacology of chronic pain. In: *Trends Pharmacol. Sci.* 15 (6), S. 190–197.

Ertürk, A.; Hellal, F.; Enes, J.; Bradke, F. (2007): Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. In: *J. Neurosci.* 27 (34), S. 9169–9180.



- Eslamboli, Andisheh; Romero-Ramos, Marina; Burger, Corinna; Bjorklund, Tomas; Muzyczka, Nicholas; Mandel, Ronald J. et al. (2007): Long-term consequences of human alpha-synuclein overexpression in the primate ventral midbrain.  
In: *Brain* 130 (Pt 3), S. 799–815.
- Ferreon, A. C. M; Gambin, Y.; Lemke, E. A.; Deniz, A. A. (2009):  
Interplay of alpha-synuclein binding and conformational switching probed by single-molecule fluorescence. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (14), S. 5645–5650.
- Ferrer, I.; Martinez, A.; Blanco, R.; Dalfó, E.; Carmona, M. (2011):  
Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease. In: *J Neural Transm* 118 (5), S. 821–839.
- Fu, Z.; Chen, C.; Barbieri, J. T.; Kim, J. P.; Baldwin, M. R. (2009):  
Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F. In: *Biochemistry* 48 (24), S. 5631–5641.
- Fujita, M.; Sugama, S.; Sekiyama, K.; Sekigawa, A.; Tsukui, T.; Nakai, M. et al. (2010):  
A  $\beta$ -synuclein mutation linked to dementia produces neurodegeneration when expressed in mouse brain. In: *Nat Commun* 1, S. 110.
- Gasior, M.; Tang, R.; Rogawski, M. A. (2013): Long-lasting attenuation of amygdala-kindled seizures after convection-enhanced delivery of botulinum neurotoxins a and B into the amygdala in rats. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 346 (3), S.
- Gerlach, M.; Reichmann, H.; Riederer, P. (2003): Die Parkinson-Krankheit.  
Grundlagen, Klinik, Therapie. 4. Aufl. Wien: Springer Verlag.
- Gill, D. M. (1982): Bacterial toxins: a table of lethal amounts.  
In: *Microbiol. Rev.* 46 (1), S. 86–94.
- Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Davies, S. W. (1998): Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. In: *Curr. Opin. Neurobiol.* 8 (5), S. 619–632.

- Grace, A. A. (2008): Physiology of the normal and dopamine-depleted basal ganglia: Insights into levodopa pharmacotherapy. In: *Mov Disord.* 23 (S3), S. S560.
- Graybiel, A. M. (2000): The basal ganglia. In: *Curr. Biol.* 10 (14), S. R509-11.
- Gutteridge, J. M. (1992): Iron and oxygen radicals in brain.  
In: *Ann. Neurol.* 32 Suppl, S. S16-21.
- Halliwell, B. (2006): Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?  
In: *J. Neurochem.* 97 (6), S. 1634–1658.
- Hawkes, C. H.; Del Tredici, K.; Braak, H. (2007): Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis.  
In: *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33 (6), S. 599–614.
- Hawkes, Christopher H.; Del Tredici, Kelly; Braak, Heiko (2009): Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170, S. 615–622.
- Hellewell, S. C.; Yan, E. B.; Agyapomaa, D. A.; Bye, N.; Morganti-Kossmann, M. C. (2010):  
Post-traumatic hypoxia exacerbates brain tissue damage: analysis of axonal injury and glial responses.  
In: *J. Neurotrauma* 27 (11), S. 1997–2010.
- Holzmann, C.; Dräger, D.; Mix, E.; Hawlitschka, A.; Antipova, V.; Benecke, R.; Wree, A.  
(2012): Effects of intrastriatal botulinum neurotoxin A on the behavior of Wistar rats.  
In: *Behav. Brain Res.* 234 (1), S. 107–116.
- Houle, J. D.; Jin, Y. (2001): Chronically injured supraspinal neurons exhibit only modest axonal dieback in response to a cervical hemisection lesion.  
In: *Exp. Neurol.* 169 (1), S. 208–217.
- Jankovic, J. (2013): Medical treatment of dystonia. In: *Mov. Disord.* 28 (7), S. 1001–1012.

- Jaspers, G W C; Pijpe, J.; Jansma, J. (2011): The use of botulinum toxin type A in cosmetic facial procedures. In: *Int J Oral Maxillofac Surg* 40 (2), S. 127–133.
- Kawaguchi, Y.; Wilson, C. J.; Augood, S. J.; Emson, P. C. (1995): Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. In: *Trends Neurosci.* 18 (12), S. 527–535.
- Kordower, J. H.; Chu, Y.; Hauser, R. A.; Freeman, T. B.; Olanow, C. W. (2008): Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. In: *Nat. Med.* 14 (5), S. 504–506.
- Lang, A. E.; Lozano, A. M.; Montgomery, E.; Duff, J.; Tasker, R.; Hutchinson, W. (1997): Posteroventral medial pallidotomy in advanced Parkinson's disease. In: *N. Engl. J. Med.* 337 (15), S. 1036–1042.
- Langston, J. W. (2006): The parkinson's complex: Parkinsonism is just the tip of the iceberg. In: *Ann Neurol.* 59 (4), S. 591–596.
- Lau, L. M. L. de; Breteler, M. M. B. (2006): Epidemiology of Parkinson's disease. In: *The Lancet Neurology* 5 (6), S. 525–535.
- Li, Y.; Raisman, G. (1995): Sprouts from cut corticospinal axons persist in the presence of astrocytic scarring in long-term lesions of the adult rat spinal cord. In: *Exp. Neurol.* 134 (1), S. 102–111.
- Lozano, A. M.; Lang, A. E.; Galvez-Jimenez, N.; Miyasaki, J.; Duff, J.; Hutchinson, W. D.; Dostrovsky, J. O. (1995): Effect of GPi pallidotomy on motor function in Parkinson's disease. In: *Lancet* 346 (8987), S. 1383–1387.
- Luisetto, S.; Rossetto, O.; Montecucco, C.; Pavone, F. (2003): Toxicity of botulinum neurotoxins in central nervous system of mice. In: *Toxicon* 41 (4), S. 475–481.

- Mahrhold, S.; Rummel, A.; Bigalke, H.; Davletov, B.; Binz, T. (2006):  
The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin  
A into phrenic nerves. In: *FEBS Lett.* 580 (8), S. 2011–2014.
- Mallet, N.; Ballion, B.; Le Moine, C.; Gonon, F. (2006):  
Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum  
of parkinsonian rats. In: *J. Neurosci.* 26 (14), S. 3875–3884.
- Marsden, C. D. (1982): Basal ganglia disease. In: *Lancet* 2 (8308), S. 1141–1147.
- McNaught, K. St P; Belizaire, R.; Isacson, O.; Jenner, P.; Olanow, C. W. (2003):  
Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease.  
In: *Exp. Neurol.* 179 (1), S. 38–46.
- Meredith, G. E.; Sonsalla, P. K.; Chesselet, M. (2008): Animal models  
of Parkinson's disease progression. In: *Acta Neuropathol.* 115 (4), S. 385–398.
- Montgomery, E. B. (1999): Deep brain stimulation reduces symptoms of Parkinson disease.  
In: *Cleve Clin J Med* 66 (1), S. 9–11.
- Müller, T. (2012): Drug therapy in patients with Parkinson's disease.  
In: *Transl Neurodegener* 1 (1), S. 10.
- Nambu, A. (2005): A new approach to understand the pathophysiology of Parkinson's  
disease. In: *J. Neurol.* 252 Suppl 4, S. IV1-IV4.
- Neychev, V. K.; Gross, R. E.; Lehericy, S.; Hess, E. J.; Jinnah, H. A.  
(2011): The functional neuroanatomy of dystonia.  
In: *Neurobiol. Dis.* 42 (2), S. 185–201.

- Nishiki, T.; Tokuyama, Y.; Kamata, Y.; Nemoto, Y.; Yoshida, A.; Sekiguchi, M. et al. (1996): Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin II cDNA. In: *Neurosci. Lett.* 208 (2), S. 105–108.
- Obeso, J. A.; Marin, C.; Rodriguez-Oroz, C.; Blesa, J.; Benitez-Temiño, B.; Mena-Segovia, Juan et al. (2008b): The basal ganglia in Parkinson's disease: Current concepts and unexplained observations. In: *Ann Neurol.* 64 (S2), S. S30.
- Obeso, J. A.; Rodriguez-Oroz, M. C.; Goetz, C. G.; Marin, C.; Kordower, J. H.; Rodriguez, M. et al. (2010): Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. In: *Nat Med* 16 (6), S. 653–661.
- Obeso, Jose A.; Rodríguez-Oroz, Maria Cruz; Benitez-Temino, Beatriz; Blesa, Francisco J.; Guridi, Jorge; Marin, Concepció; Rodriguez, Manuel (2008a): Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease. In: *Mov Disord.* 23 (S3), S. S548.
- Oguma, K.; Fujinaga, Y.; Inoue, K. (1995): Structure and function of Clostridium botulinum toxins. In: *Microbiol. Immunol.* 39 (3), S. 161–168.
- Olanow, C. W.; Tatton, W. G. (1999): Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. In: *Annu. Rev. Neurosci.* 22, S. 123–144.
- Peng, L.; Tepp, W. H.; Johnson, E. A.; Dong, M. (2011): Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. In: *PLoS Pathog.* 7 (3), S. e1002008.
- Pisani, A.; Bernardi, G.; Ding, J.; Surmeier, D. J. (2007): Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. In: *Trends Neurosci.* 30 (10), S. 545–553.

- Polymeropoulos, M. H.; Lavedan, C.; Leroy, E.; Ide, S. E.; Dehejia, A.; Dutra, A. et al. (1997): Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. In: *Science* 276 (5321), S. 2045–2047.
- Rabinak, C. A.; Nirenberg, M. J. (2010): Dopamine agonist withdrawal syndrome in Parkinson disease. In: *Arch. Neurol.* 67 (1), S. 58–63.
- Rossetto, O.; Megighian, A.; Scorzeto, M.; Montecucco, C. (2013): Botulinum neurotoxins. In: *Toxicon* 67, S. 31–36.
- Rummel, A.; Häfner, K.; Mahrhold, S.; Darashchonak, N.; Holt, M.; Jahn, R. et al. (2009): Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. In: *J. Neurochem.* 110 (6), S. 1942–1954.
- Rummel, A.; Karnath, T.; Henke, T.; Bigalke, H.; Binz, T. (2004): Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. In: *J. Biol. Chem.* 279 (29), S. 30865–30870.
- Schiavo, G.; Matteoli, M.; Montecucco, C. (2000): Neurotoxins affecting neuroexocytosis. In: *Physiol. Rev.* 80 (2), S. 717–766.
- Shimizu, H.; Kawamura, S.; Ozaki, K. (2003): An essential role of Rab5 in uniformity of synaptic vesicle size. In: *J. Cell. Sci.* 116 (Pt 17), S. 3583–3590.
- Silver, J.; Miller, J. H. (2004): Regeneration beyond the glial scar. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2), S. 146–156.
- Snyder, H.; Mensah, K.; Theisler, C.; Lee, J.; Matouschek, A.; Wolozin, B. (2003): Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. In: *J. Biol. Chem.* 278 (14), S. 11753–11759.

Sofic, E.; Lange, K. W.; Jellinger, K.; Riederer, P. (1992): Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease.

In: *Neurosci. Lett.* 142 (2), S. 128–130.

Spencer, J. P.; Jenner, P.; Daniel, S. E.; Lees, A. J.; Marsden, D. C.; Halliwell, B. (1998): Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species.

In: *J. Neurochem.* 71 (5), S. 2112–2122.

Standaert, D. G. (2011): Update on the pathology of dystonia.

In: *Neurobiol. Dis.* 42 (2), S. 148–151.

Surmeier, D. J.; Ding, J.; Day, M.; Wang, Z.; Shen, W. (2007): D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons.

In: *Trends Neurosci.* 30 (5), S. 228–235.

Suzuki, F.; Junier, M. P.; Guilhem, D.; Sørensen, J. C.; Onteniente, B. (1995): Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. In: *Neuroscience* 64 (3), S. 665–674.

Takahashi, H.; Wakabayashi, K. (2001): The cellular pathology of Parkinson's disease.

In: *Neuropathology* 21 (4), S. 315–322.

Tepper, J. M.; Koós, T.; Wilson, C. J. (2004): GABAergic microcircuits in the neostriatum. In: *Trends Neurosci.* 27 (11), S. 662–669.

Tintner, Ron; Manian, Prasad; Gauthier, Polly; Jankovic, Joseph (2005): Pleuropulmonary fibrosis after long-term treatment with the dopamine agonist pergolide for Parkinson Disease. In: *Arch. Neurol.* 62 (8), S. 1290–1295.

- Tom, V. J.; Steinmetz, M. P.; Miller, J. H.; Doller, C. M.; Silver, J. (2004):  
Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the  
hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal  
cord injury. In: *J. Neurosci.* 24 (29), S. 6531–6539.
- Turrens, Julio F. (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species.  
In: *J. Physiol. (Lond.)* 552 (Pt 2), S. 335–344.
- Umemura, A.; Jaggi, J. L.; Hurtig, H. I.; Siderowf, A. D.; Colcher, A.; Stern, M. B.;  
Baltuch, G. H. (2003): Deep brain stimulation for movement disorders: morbidity and  
mortality in 109 patients. In: *J. Neurosurg.* 98 (4), S. 779–784.
- Ungerstedt, U.; Butcher, L. L.; Butcher, S. G.; Andén, N. E.; Fuxe, K. (1969):  
Direct chemical stimulation of dopaminergic mechanisms in the neostriatum of the rat.  
In: *Brain Res.* 14 (2), S. 461–471.
- Verderio, C.; Rossetto, O.; Grumelli, C.; Frassoni, C.; Montecucco, C.; Matteoli, M. (2006):  
Entering neurons: botulinum toxins and synaptic vesicle recycling.  
In: *EMBO Rep.* 7 (10), S. 995–999.
- Weaver, F. M.; Follett, K.; Stern, M.; Hur, K.; Harris, C.; Marks, W. J. et al. (2009):  
Bilateral deep brain stimulation vs best medical therapy for patients with advanced  
Parkinson disease: a randomized controlled trial.  
In: *JAMA* 301 (1), S. 63–73.
- Welch, M. J.; Purkiss, J. R.; Foster, K. A. (2000): Sensitivity of embryonic rat dorsal root  
ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins. In: *Toxicon* 38 (2), S. 245–258.
- Wree, A.; Mix, E.; Hawlitschka, A.; Antipova, V.; Witt, M.; Schmitt, O.; Benecke, R. (2011):  
Intrastriatal botulinum toxin abolishes pathologic rotational behaviour and induces  
axonal varicosities in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease.  
In: *Neurobiol. Dis.* 41 (2), S. 291–298.



Zecca, L.; Tampellini, D.; Gerlach, M.; Riederer, P.; Fariello, R. G.; Sulzer, D. (2001):  
Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour.  
In: *MP, Mol. Pathol.* 54 (6), S. 414–418.

Zimmerberg, J.; Chernomordik, L.V. (1999): Membrane fusion.  
In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 38 (3), S. 197–205.

## 5.3 Veröffentlichungen

### 5.3.1 Posterbeiträge

Juliane Mehlan, **Hans Brosig**, Alexander Hawlitschka, Oliver Schmitt, Eilhard Mix, Andreas Wree

Interstriatal Botulinum Neurotoxin-A Injection in rats is not cytotoxic - A histological and stereological analysis  
(10. Treffen der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, 13.03.2013 - 16.03.2013 in Göttingen)

Juliane Mehlan, **Hans Brosig**, Alexander Hawlitschka, Oliver Schmitt, Eilhard Mix, Andreas Wree

Intrastriatal botulinum neurotoxin- A injection in rats does not damage striatal cholinergic neurons - a histological and stereological analysis  
(108. Treffen der Deutschen Anatomischen Gesellschaft, 22.03.2013 - 25.03.2013 in Magdeburg)

## 5.4 Erklärung der eigenständigen Anfertigung

Hiermit gebe ich folgende Erklärung ab:

1.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

2.

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den .....

.....

Hans Brosig

## **5.5 Lebenslauf**

## **6. Danksagung**

Ich möchte zunächst Herrn Professor Wree dafür danken, dass er mich in seiner Vorlesung für die Neuroanatomie begeisterte, ich an diesem Promotionsthema arbeiten durfte, Zugriff auf die Vielzahl von Arbeitsmaterial hatte und nicht zuletzt für all die Ratschläge, die er jeder Zeit für mich hatte. Auch gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Hawlitschka, ohne welchen die Laborarbeit nicht möglich gewesen wäre und der stets die Ruhe und Geduld für unzählige Fragen und Erklärungen hatte. In diesem Zusammenhang möchte ich ebenfalls Herrn Professor Schmitt danken, der mich wesentlich beim Auswerten der histologischen Schnitte unterstützt hat. Auch Frau Dr. Antipova möchte ich für die vielen Ratschläge im Rahmen der Auswertung danken. Ferner gilt mein Dank Frau Winzer, Frau Lehmann und all den anderen technischen Assistenten, ohne welche ich kein histologisches Material zum auswerten gehabt hätte. Nicht zuletzt möchte ich Herrn Professor Benecke danken, dessen Idee es war BoNT-A zur Therapie der Parkinsonerkrankung einzusetzen und der dieser Projekt in jeder Form unterstützt!

Vor allem möchte ich meinen Eltern danken, für die ständige Unterstützung, für alles! Ebenfalls möchte ich meinen Freunden danken, mit denen ich zahllose Diskussionen geführt habe und die immer ein wichtiger Teil in meinem Leben sein werden.

**Danke!**