Aus dem Institut für Anatomie

der Universität Rostock

Direktor: Professor Dr. med. A. Wree

Auswirkung einer intrastriatalen Injektion von Botulinum-Neurotoxin-A auf die cholinergen Interneurone des Caudatus-Putamen-Komplexes der Maus: eine quantitative Studie

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Sarah Witt, geb. am 11.08.1990 in Potsdam

Rostock, 2017

urn:nbn:de:gbv:28-diss2018-0147-4

Meiner Familie, meinen Freunden

und meinem Partner

Dekan:	Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger
1. Gutachter	Prof. Dr. med. Karlhans Endlich Universitätsmedizin Greifswald
2. Gutachter	PD Dr. med. Christoph Kamm Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter	Prof. Dr. med. Andreas Wree Universitätsmedizin Rostock

Eröffnung des Promotionsverfahrens:	Juni 2017
Datum der Verteidigung:	Juli 2018

Teilergebnisse der Arbeit wurden publiziert in (eingereicht):
Hawlitschka, A.; Holzmann, C.; Witt, S.; Spiewok, J.; Neumann, A.-M.; Schmitt, O.; Wree, A.; Antipova, A. (2017): Intrastriatally injected botulinum neurotoxin-A differently effects cholinergic and dopaminergic fibers in C57BL/6 mice

Zusammenfassung

Der Morbus Parkinson ist eine der bedeutendsten Erkrankungen unserer heutigen, vom demografischen Wandel geprägten Zeit. Bis zu 4% der 80-Jährigen sind betroffen, sie stellt eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen dar.

Bereits 1817 wurden die Symptome von James Parkinson, dem Erstbeschreiber und Namensgeber, festgehalten. Die Kardinalsymptome der Erkrankung sind Tremor, Rigor, Bradykinese und posturale Instabilität, jedoch gehören auch viele weitere nichtmotorische Symptome zum Beschwerdebild. So klagen einige Patienten auch über vegetative Symptome wie Obstipation oder Kreislaufinstabilität und über psychische Symptome wie Depressionen. Das Kommunikationsvermögen ist durch Mikrografie, Hypomimie und Sprachstörungen zusätzlich eingeschränkt, sodass die Patienten einen hohen Leidensdruck aufweisen.

Obwohl die Erkrankung mittlerweile fast 200 Jahre bekannt ist, konnte bis heute für die überwiegende Zahl der Erkrankungen noch keine ursächliche Noxe gefunden und deshalb keine kausale Therapie etabliert werden. Alle Therapiemaßnahmen beschränken sich auf symptomatische Ansätze. Sicher ist nur, dass das Alter einen Risikofaktor darstellt und es histologisch zu einem Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta kommt. Ziel heutiger pharmakologischer Therapien ist daher die Steigerung dopaminerger Restfunktion oder Hemmung des durch das Ungleichgewicht entstehenden Hypercholinismus. Die dopaminerge Wirkung kann zum Beispiel durch L-Dopa oder Dopaminrezeptoragonisten erzielt werden, während der Hypercholinismus mittels systemischer Anticholinergika oder Inhibitoren der Acetylcholinfreisetzung therapiert werden kann.

Zu den Acetylcholinfreisetzungsinhibitoren gehören auch die Botulinum-Neurotoxine, die durch Störung des SNARE-Komplexes die Fusion Acetylcholin-haltiger Vesikel mit der präsynaptischen Membran und somit die Exozytose hemmen. Die Toxine werden von verschiedenen gramnegativen, anaeroben Clostridien-Arten produziert und gehören zu den giftigsten natürlichen Substanzen. Schon heute ist die Therapie mit Botulinum-Neurotoxinen bei vielen Krankheiten mit cholinerger Symptomatik etabliert, so zum Beispiel bei Dystonien oder der überaktiven Blase. Daher liegt es nahe, auch die

intrastriatale Injektion von Botulinum-Neurotoxinen als Therapieoption in Betracht zu ziehen, vor allem weil die klassische systemische anticholinerge Therapie mit vielen Nebenwirkungen verbunden ist.

Vorteil intrastriataler Injektion von Botulinum-Neurotoxin-A ist jedoch nicht nur die Reduktion generalisierter anticholinerger Nebenwirkungen, sondern auch eine wesentliche Reduktion der Beschwerden bei unbeeinflussten kognitiven Fähigkeiten und Verhalten. Konnten vorangegangene Veröffentlichungen zeigen, dass die Botulinum-Neurotoxin-Injektion keinerlei zytotoxische Effekte auf striatale Neurone im Tiermodell der Ratte aufweist, so wird hier erstmals mit dem Tiermodell der Maus die experimentelle intrastriatale Botulinum-Neurotoxin-A-Injektion (BoNT-A) als potentielle Parkinsontherapie durchgeführt. In dieser Arbeit wurden im Zuge von Zählungen der cholinergen Interneurone keine Anzeichen einer Zytotoxizität gefunden.

Aufgrund des demografischen Wandels und der damit verbundenen steigenden Anzahl an Parkinson-Patienten wird die Optimierung der Therapie des Morbus Parkinson an Bedeutung gewinnen. Die vorliegende Arbeit stützt die Annahme, dass die intrastriatale Injektion von BoNT-A nach Untersuchungen an Mausgehirnen eine nebenwirkungsarme Komponente der künftigen Parkinsontherapie werden kann.

Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6- Hydroxydopamin
ac	Commissura anterior
ACh	Acetylcholin
AMPA	englisch: *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid*
AP	Aktionspotential
BIV	Botulinumtoxin induzierte Varikositäten
BoNT-A	Botulinum-Neurotoxin-A
cc	Corpus callosum
CD	cervicale Dystonien
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
cholin.	cholinerg/e
Co	Cortex
CPu	Caudatus Putamen
DBS	englisch: *deep brain stimulation*
FDA	englisch: *Food and Drug Administration*
GABA	englisch*: gamma-aminobutyric acid*
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
H_2S	Schwefelwasserstoff
inj	Injektionskanal
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
KG	Körpergewicht
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LD	Letale Dosis
LV	Lateraler Ventrikel
M.	Morbus
MAO-A	Monoaminooxidase-A
MAO-B	Monoaminooxidase-B
Mio.	Millionen
N.	Nervus
NMDA	*N*-Methyl-D-Aspartat
OP	Operation

PBS	englisch: *Phosphate buffered saline*
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNAP-25	englisch: *Synaptosomal-associated protein of 25* kDa
SNARE	englisch: *soluble N-ethylmaleimide sensitive-factor attachment receptor*
SV 2	Synaptisches Vesikelprotein 2
TH	Tyrosinhydroxylase
VAMP-2	Vesikel assoziiertes Membranprotein-2
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

1	Schema zur Vernetzung der Basalganglien beim Gesunden	8
2	Schema zur Vernetzung der Basalganglien beim Kranken	12
3	Funktionsweise des BoNT	21
4	Übersicht eines Maushirns, Darstellung eines Frontalschnitts und Neurone des DS in der ChAT-Färbung	34
5	24-Well-Platten beim Färbeprozess	37
6	Auszählung der cholinergen Neurone mittels StereoInvestigator	38
7	Auszählung der Neurone	38
8	Übersicht eines Frontalschnitts eines Mausgehirns, Abbildung des Stichkanals und der Makrophagen	41
9	Gegen ChAT-gefärbte immunhistochemische Schnitte von Striata der Mausgehirne	42
10	Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der ChAT-positiven Neurone verschiedener Altersgruppen (rechte Striata)	44
11	Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der ChAT-positiven Neurone verschiedener Altersgruppen (linke Hemisphäre)	47
12	Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der ChAT-positiven Neurone verschiedener Altersgruppen (linke und rechte Striata gegenübergestellt)	48
13	Die Anzahl ChAT-positiver Neurone	49
14	Körpergewicht und Gehirngewicht (zeitlicher Verlauf)	50
15	Volumen des linken und rechten CPu (zeitlicher Verlauf)	51
16	Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der ChAT-positiven Neurone nach Injektion verschiedener Dosen von BoNT-A (rechte Striata)	53
17	Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der ChAT-positiven Neurone nach Injektion verschiedener Dosen von BoNT-A (linke Hemisphäre)	55
18	Mittelwerte und Standardfehler der Anzahl der ChAT-positiven Neurone nach Injektion verschiedener Dosen von BoNT-A (linke und rechte Striata im Vergleich).	55
19	Körpergewicht und Gehirngewicht (Dosis-Wirkungs-Beziehung)	56

20 Volumen des linken und rechten CPu (Dosis-Wirkungs-Beziehung) 57

21 Botulinumtoxin induzierte Varikositäten 58

22 Immunhistochemische Färbung gegen CHAT und TH 59

Tabellenverzeichnis

1 tabellarische Zusammenfassung der untersuchten Tiergruppen 30

2 Wichtige Maßzahlen der Versuchstiere des zeitlichen Verlaufs (rechte Hemisphäre) 43

3 Wichtige Maßzahlen der Versuchstiere des zeitlichen Verlaufs (linke Hemisphäre) 46

4 Wichtige Maßzahlen der Versuchstiere der Dosis-Wirkungs-Beziehung (rechte Hemisphäre) 52

5 Wichtige Maßzahlen der Versuchstiere der Dosis-Wirkungs-Beziehung (linke Hemisphäre) 54

6 Zählplan und -protokoll der Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung 76

7 Zählplan und -protokoll der Analyse des zeitlichen Verlaufs 77

8 „results“, Zählresultate der Dosis-Wirkungsbeziehung 78

9 „results“, Zählresultate der zeitlichen Analyse (linke Hemisphären) 78

10 „results“, Zählresultate der zeitlichen Analyse (rechte Hemisphären, Fortsetzung der Tabelle 9) 79

11 Statistische Tests zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung 82

12 Geräte und Hersteller 83

13 Chemikalien und Verbrauchmaterial, Hersteller 83

14 Primär- und Sekundärantikörper 83

15 verwendete Software 83

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1. Die Parkinson-Erkrankung 1
1.1.1. Die Epidemiologie der Parkinson-Erkrankung 1
1.1.2. Die Symptomatik der Parkinson-Erkrankung 1
1.1.3. Überlegungen zur Ätiologie des Morbus Parkinson 3
1.2. Morbus Parkinson und die Basalganglien 7
1.2.1. Die Basalganglien und ihre Verschaltung 7
1.2.2. Der Signalweg der Bewegung 8
1.2.3. Dysfunktion der Basalganglien im Rahmen des Morbus Parkinson 10
1.3. Therapiemöglichkeiten des Morbus Parkinson 12
1.3.1. Verwendung der Dopamin-Vorstufe L-Dopa 13
1.3.2. Verwendung von Dopaminrezeptoragonisten 14
1.3.3. Verwendung von Inhibitoren des Dopaminabbaus 15
1.3.4. Therapie des Morbus Parkinson mittels Ablation 15
1.3.5. Anwendung der tiefen Hirnstimulation 16
1.3.6. Verwendung von NMDA-Antagonisten 16
1.3.7. Verwendung anticholinerg wirksamer Substanzen 17
1.4. Botulinum-Neurotoxine 18
1.4.1. Allgemeines, Aufbau und Funktionsweise von Botulinum-Neurotoxinen 18
1.4.2. Botulinum-Neurotoxine als Therapieoption 21
1.5. Fragestellung dieser Arbeit 27
2. Material und Methoden 29
2.1. Verwendete Tiere 30
2.2. Narkose der Tiere 30
2.3. Intrazerebrale Injektion von BoNT-A 31
2.4. Tötung der Tiere und Fixierung ihrer Gehirne 32
2.5. Anfertigung von histologischen Parallelschnitten der Versuchstiergehirne mittels Gefriermikrotom 32
2.6. Immunhistochemische Färbung 35
2.7. Stereologische Auswertung der CPu-Neurone 37
2.7.1. Zählung der cholinergen Neurone des CPu 37
2.7.2. Statistik 39

3. Ergebnisse 40
3.1. Zeitliche Veränderungen 40
3.1.1. Zeitliche Veränderung der mittleren Gesamtzahl der ChAT-positiven Neurone des CPu der rechten Hemisphäre 40
3.1.2. Zeitliche Veränderung der mittleren Gesamtzahl der ChAT-positiven Neurone des CPu der linken Hemisphäre 45
3.1.3. Zeitliche Veränderung der mittleren Gesamtzahl der ChAT-positiven Neurone im Vergleich der behandelten und unbehandelten CPu 47
3.1.4. Zeitliche Veränderung von Körpergewicht und Hirngewicht der Mäuse 49
3.1.5. Zeitliche Veränderung vom Volumen des Striatums der Mäuse 50
3.2. Dosis-Wirkungs-Beziehung 52
3.2.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung der mittleren Gesamtzahl der ChAT-positiven Neurone des CPu der rechten Hemisphäre 52
3.2.2. Dosis-Wirkungs-Beziehung der mittleren Gesamtzahl der ChAT-positiven Neurone des CPu der linken Hemisphäre 53
3.2.3. Dosis-Wirkungs-Beziehung im Vergleich der behandelten und unbehandelten CPu 55
3.2.4. Dosis-Wirkungs-Beziehung von Körpergewicht und Hirngewicht der Mäuse 56
3.2.5. Dosis-Wirkungs-Beziehung von Volumen des Striatums der Mäuse 57
3.3. Weitere Besonderheiten 58
4. Auswertung und Diskussion 60
4.1. Auswertung der zeitlichen Analyse der Neuronenanzahlen 60
4.2. Auswertung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der Neuronenanzahlen 62
4.3. Auswertung der Körpergewichte und Hirngewichte 63
4.4. Auswertung der Volumenveränderungen des Striatums 63
4.5. Ausblick: BoNT-A als zukünftige Therapieoption 64
5. Literaturverzeichnis 66
6. Anhang 76
6.1. Tabellenanhang 76
6.2. Selbstständigkeitserklärung 84
6.3. Lebenslauf 85
7. Thesenblatt 87
8. Danksagung 88

1. Einleitung

1.1. Die Parkinson-Erkrankung

1.1.1. Die Epidemiologie der Parkinson-Erkrankung

Die Parkinson-Erkrankung stellt nach der Alzheimer-Demenz die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar und betrifft 1-2 % der über 60-Jährigen (Gerlach et al., 2003). Das Alter scheint ein Hauptrisikofaktor der Erkrankung zu sein, da es zu einem Anstieg der Prävalenz von 0,3 % bei den unter 60-Jährigen auf 1-4 % in zunehmendem Alter kommt. Gleichermaßen verhält es sich mit der Inzidenz, die von 8-18 Neuerkrankungen / 100.000 Menschen bei den unter 50-Jährigen auf 700 / 100.000 Menschen im Alter von über 80 Jahren steigt. Aufgrund des demographischen Wandels und der zunehmenden Anzahl über 80-Jährigen wird die Anzahl an Parkinson-Patienten auch weiter steigen und das Gesundheitssystem vor eine große Herausforderung stellen (Gerlach et al., 2003; Lau et al., 2006). Doch schon jetzt befinden sich allein in Deutschland 250.000 – 400.000 Menschen in Therapie (Gerlach et al., 2007).

1.1.2. Die Symptomatik der Parkinson-Erkrankung

Schon im Jahr 1817 wurde der Symptomkomplex durch den Arzt James Parkinson beschrieben. Die 4 Kardinalsymptome des Idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS) sind Rigor, Tremor, Brady- bis Akinese und posturale Instabilität (Jungnickel et al., 2011). Typisch ist ein asymmetrisches Auftreten der Symptome. Es müssen nicht zwangsläufig alle Symptome gleichzeitig auftreten und auch die Ausprägung der Symptome unterscheidet sich von Patient zu Patient. Für das Vorliegen eines Parkinson-Syndroms müssen per definitionem das Symptom der Bradykinese und ein weiteres Kardinalsymptom vorliegen (Eggert et al., 2012).

Daher kann man den Morbus Parkinson nach vorherrschender Symptomatik in drei Gruppen einteilen. Es gibt den Tremordominanz-Typ, den akinetisch-rigiden Typ und den Äquivalenz-Typ. Der Tremordominanz-Typ ist vor allem durch den Tremor gekennzeichnet und tritt vor allem bei jüngeren Patienten auf. Beim akinetisch-rigiden Typ ist der Tremor nur schwach ausgeprägt und die fehlende Mobilität beherrscht das Bild. Beim Äquivalenz-Typ sind Tremor und Akinese ausgeglichen (Obeso et al., 2010).

Brady- bzw. Akinese ist eine Abnahme und Verlangsamung bis hin zum Ausbleiben der Willkürmotorik. Diese mit einer Starthemmung verbundene Abnahme betrifft jegliche Muskulatur, sowohl die Extremitätenmuskulatur, als auch Gesichts- und Kehlkopfmuskulatur. Folge ist neben dem typischen kleinschrittigen Gang mit erhöhter Fallneigung auch eine Abnahme der Sprachbildung und Kommunikationsvermögen und eingeschränkte Mimik, also eine Hypomimie (Mutch et al., 1986; Skodda, 2011).

Der Rigor ist definitionsgemäß eine nicht-spastische Tonuserhöhung der Muskulatur. Diese lässt sich anhand des typischen „Zahnradphänomens" nachweisen, bei dem zum Beispiel durch eine passive Extension des Unterarms ruckartig der Tonus nachlässt und der Arm den vorgegebenen Bewegungen kurz nachgibt, sodass der Eindruck einer Zahnradbewegung aufkommt. Weiterhin kommen Muskelschmerzen und eine eingeschränkte Feinmotorik, die zu Mikrographie führen kann, hinzu. Auch dies beeinflusst das Kommunikationsvermögen negativ.

Der Tremor ist ein langsamer Ruhetremor mit einer Frequenz von 4-6 Hz (Lang und Lozano, 1998), welcher der Parkinson-Erkrankung auch den typischen Namen der Schüttellähmung oder „shaking palsy" gibt. Schon James Parkinson verwendete diese Bezeichnung, die auch umgangssprachlich gebraucht wird.

Die posturale Instabilität bedeutet die Unfähigkeit des Patienten nach einem extern einwirkenden Bewegungsimpuls das Gleichgewicht zu gewährleisten. Diese bedingt die hohe Fall- und Sturzneigung und kann vor allem in Kombination mit dem kleinschrittigen Gang zu einer hohen Verletzungsrate führen.

Der Morbus Parkinson betrifft jedoch leider nicht nur das motorische Nervensystem, sondern auch das vegetative Nervensystem. Zu den vegetativen Symptomen gehören neben Störungen des Geruchsempfindens und der Talgproduktion mit Salbengesicht auch Obstipation, Kreislaufinstabilität aufgrund des Untergangs vegetativer Innervation des Herzens, Schlafstörungen insbesondere des REM-Schlafes, Schmerzen und Depressionen. Diese vegetative Symptomatik kann neben, aber auch vor der motorischen Symptomatik auftreten, sodass Geruchsstörungen, Depressionen und Obstipation zum Beispiel teilweise als Frühsymptom von Parkinson gewertet werden (Langston, 2006; Obeso et al., 2010).

Klinisch können sich auch weitere fakultative Begleitsymptome wie sensorische, psychische oder auch kognitive Auffälligkeiten zeigen (Eggert et al., 2012).

1.1.3. Überlegungen zur Ätiologie des Morbus Parkinson

Die Erkrankung lässt sich in zwei große Gruppen klassifizieren. So stellt man der primären Form, auch Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS) genannt, die sekundäre bzw. symptomatische Form gegenüber. Der Begriff „Morbus Parkinson" ist mit dem IPS und der Parkinson-Erkrankung gleichzusetzen und wird synonym verwendet.

Wie bereits der Name suggeriert, ist die Ursache des Idiopathischen Parkinson-Syndroms bis heute ungeklärt. Das IPS macht 75 % aller Parkinson-Erkrankungen aus.

Bei den sekundären Formen können Mutationen in den Genen PARK 1-13 (Brockmann und Gasser, 2010), Traumata, Tumore und andere Raumforderungen, Entzündungen, toxische Schädigungen, metabolische Störungen wie Morbus Wilson oder Hypoparathyreodismus (Eggert et al., 2012; Lau und Breteler, 2006) und Medikamente wie die klassischen Neuroleptika zu denen z.B. Haloperidol gehört, aber auch Lithium, Flunarizin, Valproat etc. ursächlich sein. Hinsichtlich der Symptomatik unterscheiden sich die verschiedenen Subtypen jedoch kaum.

Auf zellulärer Ebene ist das IPS durch den Untergang dopaminerger Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNc) gekennzeichnet. Weiterhin lassen sich Lewy-Körperchen, intrazelluläre Einschlusskörperchen hauptsächlich bestehend aus α-Synuclein, in Neuronen der SNc und in anderen Bereichen des Nervensystems nachweisen (Braak und Del Tredici, 2010; Ferrer et al., 2011; Takahashi und Wakabayashi, 2001;). Warum diese Neurone untergehen ist weitgehend unbekannt, man geht jedoch von einem Zusammenspiel mehrerer pathologischer Prozesse über Jahre hinweg aus. Auffällig ist, dass sich die Lewy-Körperchen nicht gleichförmig im zeitlichen Verlauf der Erkrankung verteilen, sondern verfrüht in verschiedenen Stadien der Erkrankung an anderen Stellen des Nervensystems, z. T. lange vor symptomatischer Manifestation der Erkrankung auftreten. So zeigen sich z. B. die Lewy-Körperchen nicht selten vor oder ohne motorische Symptomatik im Vegetativum (Braak et al., 2004; Braak et al., 2008; Langston, 2006), was die Frühsymptomatik von Obstipation oder Geruchsstörungen erklärt. Anhand dieser unterschiedlichen Verteilung im Nervensystem lässt sich die Erkrankung in 6 Stadien einteilen (Braak et al., 2004).

Da die Lewy-Körperchen zuerst im dorsalen motorischen Kern des Nervus (N.) vagus und in vorderen Anteilen des Bulbus olfactorius anzutreffen sind, ist davon auszugehen, dass vor allem Neurone mit schwach myelinisierten Axonen betroffen sind. Dies stellt das Stadium 1 dar.

Im 2. Stadium erstrecken sich die Körperchen auch auf den Locus coeruleus, den medialen Raphe-Kern und den Nucleus gigantocellularis, von denen sich weitere Projektionen in das ZNS ausbreiten. Das erste und zweite Stadium zählen noch zu den präsymptomatischen Phasen.

Im 3. Stadium wird nun auch das limbische System mit einbezogen, da Hippocampus, Amygdala und enthorhinaler Kortex befallen werden. Ebenso werden die SNc und das basale Frontalhirn beeinträchtigt. Bei Befall der SNc kommt es zur motorischen Manifestation der Erkrankung.

Wenn die pathologischen Prozesse Mesocortex, das ventrale Pallidum und das ventrale Stiatum erreicht haben, befindet sich der Patient in Stadium 4.

Die Stadien 5 und 6 kennzeichnen sich durch Befall des primär sensorischen Cortex, des präfrontalen Cortex, des primär motorischen Cortex, des prämotorischen Cortex und der sensorischen Assoziationsfelder (Braak et al., 2004).

Eine mögliche Erklärung zur Entstehung der Erkrankung ist die „dual hit"-Theorie. Der Beginn der pathologischen Prozesse im Bulbus olfactorius und im N. vagus, welcher lange zum Vegetativum weisende Verbindungen besitzt, und das Fehlen von Pathologien anderenorts lassen vermuten, dass auf verschiedenen Wegen bisher unbekannte Noxen aufgenommen werden können. So bestehe auf der einen Seite die Möglichkeit der Aufnahme der Noxe direkt über den Darm oder direkt über die Nasenschleimhaut oder auf der anderen Seite indirekt über die Verbindung der Nase zur Mundhöhle und damit zum Gastrointestinaltrakt. Dort wird die toxische Substanz eventuell in die vegetativen Neurone aufgenommen und zum Bulbus olfactorius und N. vagus geleitet. Die Beobachtung früher Riechstörungen und gastrointestinaler Probleme wie Obstipation auch vor Manifestation einer motorischen Symptomatik stützen diese Hypothese und könnten den aufsteigenden Charakter der Symptomatik erklären. Und auch die Tatsache, dass die Axone betroffener Neurone schwach myelinisiert und damit schlecht

gegen äußere Noxen isoliert sind, unterstützt die Hypothese einer von außen einwirkenden Noxe (Hawkes et al., 2007; Hawkes et al., 2009).

Ein weiterer Baustein der multifaktoriellen Genese der Erkrankung könnte die besondere Stoffwechselsituation des ZNS mit verstärkter Radikalbildung sein. Verschiedene Mechanismen könnten zur Radikalanhäufung beitragen.

Auf der einen Seite verbraucht das ZNS wegen des hohen ATP-Bedarfs für ein optimales Ionen-Gleichgewicht mehr als zwanzig Prozent des über die Lungen aufgenommenen Sauerstoffs, auf der anderen Seite nimmt es nur einen Bruchteil an der Gesamtmasse des menschlichen Organismus ein (Halliwell, 2006). Das Ionen-Gleichgewicht ist für die neuronale Erregung und Signalweiterleitung essentiell. Beim Prozess der ATP-Bildung durch die Mitochondrien entstehen bereits physiologisch geringe Mengen Radikale (Turrens, 2003). Auf der anderen Seite fallen Radikale beim Metabolismus von Neurotransmittern, vor allem Katecholamine wie Dopamin, an (Spencer et al., 1998). Und zum letzten spielt Eisen bei der Entstehung von Radikalen eine wichtige Rolle, welches in der SNc vermehrt vorkommt (Gutteridge, 1992; Olanow und Tatton, 1999). Die gebildeten Radikale können durch direkte Reaktionen mit der DNA, durch Reaktionen mit Proteinen oder durch Interaktionen mit Membranlipiden die jeweiligen Zellen schädigen (Alvarez und Radi, 2003). Zum Schutz der Zelle vor Radikalen gibt es z. B. die Glutathion-Peroxidase, die reaktives Wasserstoffperoxid abbauen kann, indem sie Glutathion oxidiert. Der Spiegel eben dieser Peroxidase ist bei Parkinson-Patienten erniedrigt, sodass der Untergang dopaminerger Neurone möglicherweise auf nicht mehr kompensierten bzw. erhöhten oxidativen Stress zurückzuführen ist (Brigelius-Flohé, 1999; Sofic et al., 1992).

Weitere Bedeutung bei der multifaktoriellen Genese der Erkrankung könnte das α-Synuclein als Teil aller Lewy-Körperchen besitzen (Goedert et al., 1998). Die physiologische Funktion dieses präsynaptischen Proteins ist noch nicht geklärt (Burré et al., 2010), es scheint jedoch eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit Biomembranen zu spielen. Wenn es an Lipidmembranen gebunden ist, weist es physiologischerweise eine α-helikale Struktur auf. Bei mutierten Formen, wie sie bei Familien mit genetisch bedingtem Parkinson auftreten können (Polymeropoulos et al., 1997), und bei höheren Konzentrationen ist der Anteil an β-Faltblattstrukturen erhöht und es kann zur Ausbildung von Aggregaten kommen (Angot und Brundin, 2009; Conway et al., 1998;

Ferreon et al., 2009). Diese Aggregate sind nicht nur nicht mehr membrangebunden, sondern können auch schlecht proteasomal abgebaut werden, wodurch die Proteasomen in ihrer Funktion gestört werden. Es kommt zu einem Anstieg der α-Synuclein-Konzentration und damit zur Förderung der Aggregatbildung (McNaught et al., 2003; Snyder et al., 2003). Durch die ansteigende Konzentration dieses Proteins könnte der Untergang dopaminerger Neurone induziert werden (Eslamboli et al., 2007). Beim Untergang wird wiederum fehlgefaltetes Protein freigesetzt, es könnte jedoch auch durch Exozytose noch vitaler Zellen nach außen gelangen. Verwunderlich ist, dass die Neurone die eigentlich wichtigen Signalsequenzen der Exozytose gar nicht besitzen und auch zelluläre Inhibitoren wirkungslos sind, was eine noch unbekannte Form der Exozytose nahe legt (Eslamboli et al., 2007). Das freigesetzte Protein könnte wiederum über einen langsamen nicht inhibierbaren noch unbekannten Rezeptor z. B. endozytotisch aufgenommen werden oder gelangt möglicherweise schnell und passiv über noch unbekannte Wege in benachbarte Neurone. In den noch gesunden Neuronen bewirkt das abnorme Protein eventuell eine Fehlfaltung des nativen Synucleins, was der Parkinson-Erkrankung den Charakter einer Prionenerkrankung verleiht (Angot und Brundin, 2009). Unterstützt wird diese Theorie von der Tatsache, dass auch gesunde mesenzephale fetale Neurone nach Implantation in das Putamen von Parkinson-Patienten nach Jahren im erkrankten Empfängerhirn Lewy-Körperchen aufweisen (Kordower et al., 2008; Li et al., 1995).

Das anfangs nur bei wenigen Krankheiten wie Scrapie oder Creutzfeldt-Jakob-Krankheit anwendbare Konzept einer Prionen-Erkrankung könnte nun auch auf neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Alzheimer-Demenz angewendet werden, da ähnliche Vorgänge zu Anhäufungen von Proteinen führen (Goedert, 2015).

1.2. Morbus Parkinson und die Basalganglien

1.2.1. Die Basalganglien und ihre Verschaltung

Die Basalganglien sind Teil des extrapyramidalmotorischen Systems und stellen subkortikale Kerne des ZNS dar. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Ausführung von Bewegungen und integrativen Hirnfunktionen. Sie modulieren den von den motorischen und assoziativen Kortexarealen stammenden Impuls, damit die Bewegung initiiert und ausgeführt werden kann. Die Basalganglien spielen jedoch nicht nur in der Motorik eine Rolle, sondern auch bei kognitiven Abläufen wie Aufmerksamkeit, Gewohnheitsbildung, Lernprozessen und der Ausbildung von Zeitgefühl (Obeso et al., 2008a). Über den Nucleus accumbens stehen die Basalganglien mit dem limbischen System in Verbindung, was für Prozesse wie flexibles bzw. verändertes Verhalten in verschiedenen Situationen wichtig ist (Grace et al., 2008). Für den Morbus Parkinson steht jedoch vor allem die motorische Funktion der Basalganglien im Vordergrund und soll daher hauptsächlich erklärt werden.

Zu den Basalganglien gehören der Globus pallidus, bestehend aus Pallidum internum und externum (GPe und GPi), und das Striatum, was wiederum aus Nucleus caudatus und Putamen besteht. Der Nucleus caudatus und das Putamen entstammen ontogenetisch einer gemeinsamen Anlage. Das „streifige“ Erscheinungsbild des Striatum entsteht durch die entwicklungsbedingte, unvollständige Auseinandertreibung beider Regionen durch die Capsula interna beim Menschen und war namensgebend für das Striatum. Der Nucleus caudatus legt sich schweifförmig (lat. caudatus = schwanzförmig) um das Putamen (lat. putamen = Schale). Das Pallidum liegt medial des Putamen. Weiterhin können aus funktionellen Gesichtspunkten der entwicklungsgeschichtlich zum ventralen Thalamus gehörende Nucleus subthalamicus (STN) und die Substantia nigra, bestehend aus einer Pars reticulata und einer Pars compacta (SNr und SNc), zu den Basalganglien gezählt werden. Die schwarze Farbe des Neuromelanins der Substantia nigra verursacht dessen gräuliche Färbung und erklärt den Namen. Es stellt strukturell ein Polymer des Dopamins dar (Zecca et al., 2001).

Zu 95% Prozent besteht das Striatum aus GABAergen Projektionsneuronen (Pisani et al., 2007). Diese sind afferent in einem Verhältnis von 1000:1 mit kortikalen glutamatergen Neuronen verbunden (Obeso et al., 2008a), sowie mit dem intralaminären Teil des Thalamus und den Raphe-Kernen (Marsden, 1982). Auch von

der SNc gelangen Afferenzen zum Striatum. Sie sind dopaminerg und bilden jeweils ca. 1 Millionen Verbindungen mit spezifischen Neuronen des Striatum und erreichen sowohl cholinerge als auch GABAerge Interneurone (Grace et al., 2008). Efferenzen bildet das Striatum sowohl direkt als auch indirekt über das Pallidum externum zum internum. Afferenzen des Pallidum sind glutamaterg und kommen vom STN. Efferenzen bildet das Pallidum GABAerg zum anteroventralen, ventrolateralen und dorsomedialen Kern des Thalamus. Diese Kerne wiederum stehen glutamaterg mit motorischen und präfrontalen Kortexarealen in Verbindung (Albin et al., 1989). Und schließlich sendet der Kortex glutamaterge afferente Fasern zum STN.

Die wichtigsten Verknüpfungen sind aufgrund ihrer Komplexität in **Abbildung 1** schematisch dargestellt.

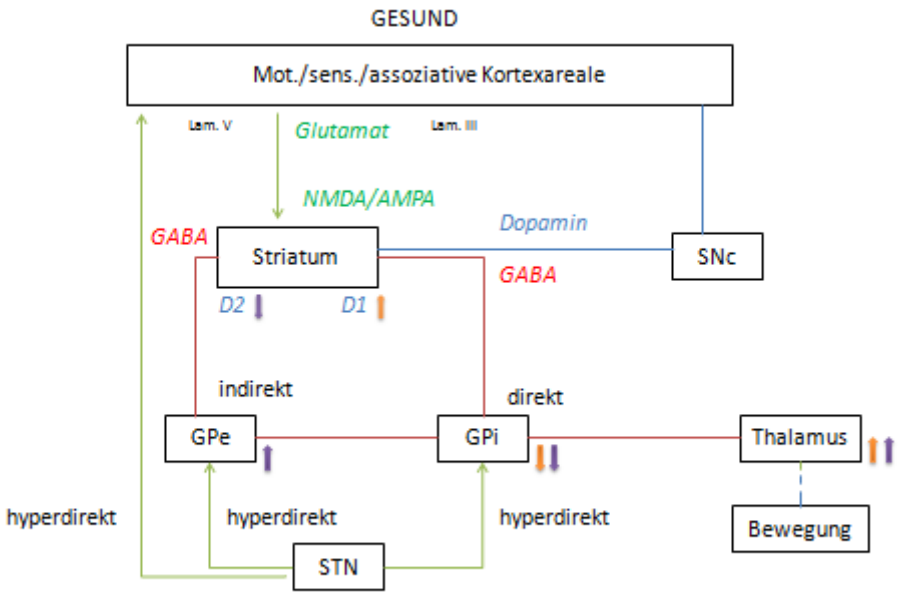

Abbildung 1: Schema zur Vernetzung der Basalganglien beim Gesunden. Erregende Verbindungen sind grün und mit Pfeilspitzen, hemmende Erregungen sind rot und ohne Pfeilspitzen, dopaminerge Verbindungen sind blau dargestellt. Mot.= motorische, sens.= sensible, SNc= Substantia nigra pars compacta, GPe= Globus pallidus externus, GPi= Globus pallidus internus, STN= Nucleus subthalamicus, Pfeil nach oben=gesteigerte Aktivität, Pfeil nach unter=verminderte Aktivität, gelb=direkter Weg, violett=indirekter Weg

1.2.2. Der Signalweg der Bewegung

Um eine Bewegung auszuführen müssen glutamaterge Impulse von motorischen, sensorischen und assoziativen Kortexarealen über NMDA- und AMPA- Rezeptoren an das Striatum gesendet werden (Surmeier et al., 2007). Von dort senden GABAerge

Projektionsneurone die Erregungen entweder direkt an den GPi oder indirekt an den GPi über den GPe, welcher ebenfalls GABAerge Afferenzen erhält (Obeso et al., 2008a). Um die starke Erregung des Striatums zu modulieren und Motorik in einem adäquaten Ausmaß zu gewährleisten, wirken über dopaminerge Signale der Substantia nigra auch weitere Impulse des Kortex auf das Striatum.

Die Neurone des Striatum unterscheiden sich im „direkten" und im „indirekten Weg" auf zweierlei Arten. Zum einen entstammen die auf sie projizierten Neurone des Kortex aus unterschiedlichen Regionen, nämlich Lamina III beim direkten Weg und Lamina V beim indirekten. Zum anderen unterscheiden sich die Neurone hinsichtlich des exprimierten Dopaminrezeptors, die beim direkten Weg D1- und beim indirekten Weg D2-Rezeptoren aufweisen, welche eine entgegengesetzte Wirkung auf die Erregbarkeit des Striatums nach sich ziehen (Obeso et al., 2008a). So erhöhen D1-Rezeptoren durch stimulatorische G-Proteine die Erregbarkeit der striatalen Neurone gegenüber kortikalen Afferenzen durch Erhöhung der Dichte der NMDA- und AMPA-Rezeptoren und Aktivierung von Calcium-Kanälen. Die D2-Rezeptoren senken die Erregbarkeit mit inhibitorischen G-Proteinen durch Verminderung der Dichte von Glutamat-Rezeptoren und Inaktivierung von Natriumkanälen (Surmeier et al., 2007). Wenn das Striatum nun beim direkten Weg „sensibler" gegenüber kortikalen Afferenzen ist, kann es das GPi stärker hemmen und der Thalamus wiederum wird dadurch enthemmt. Wenn das Striatum nicht gut erregt wird, dann ist der GPe aktiv und hemmt den GPi, sodass wieder der Thalamus erregt wird. Bei diesem indirekten Weg wird also durch die Ausschüttung von Dopamin aus der SNc über D2-Rezeptoren im Striatum die Erregbarkeit des Striatums gegenüber kortikalen Afferenzen gesenkt, sodass dessen Aktivität abnimmt. Da das Striatum hemmende GABAerge Signale an den GPe senden würde, wird dieser nun enthemmt und dessen Aktivität steigt. Der GPe kann daher verstärkt den GPi hemmen, dessen Aktivität und damit dessen hemmender Einfluss auf den Thalamus sinkt. Schlussendlich wird also auch beim indirekten Weg die Aktivität des Thalamus gesteigert.

Ähnlich werden die kortikalen Afferenzen zum Striatum durch Dopamin gesteuert. So steigert Dopamin in der Lamina III die Ausschüttung von Glutamat und in der Lamina V hemmt es die Afferenzen (Obeso et al., 2008b).

Die verbleibenden Neurone des Striatums sind GABAerge und cholinerge Interneurone (Pisani et al., 2007), die auch dopaminerg über D2-Rezeptoren von kortikalen Afferenzen moduliert werden (Surmeier et al., 2007). Auch wenn die GABAergen Interneurone verschiedene Subtypen haben, wirken sie jedoch größtenteils inhibierend auf die striatalen Projektionsneurone (Kawaguchi et al., 1995; Tepper et al., 2004). Die cholinergen Interneurone wirken vor allem über M1 und M4-Acetylcholinrezeptoren im Striatum (Pisani et al., 2007).

Neben dem direkten und indirekten Weg des Kortex über das Striatum zum Pallidum gibt es noch einen weiteren, schnelleren, disynaptischen „hyperdirekten" Weg des Kortex über den Nucleus subthalamicus zum Pallidum. So führt ein Signal vom Kortex über den STN zur Aktivierung des GPi, welcher im Thalamus gewünschte als auch unerwünschte Bewegungen hemmt.

Im Striatum folgt daraufhin eine Modulation und das Signal wird über den direkten Weg zum GPi geleitet und sorgt im Thalamus für die gewünschte Disinhibition der Bewegung, damit wird das Signal des STN moduliert. Schlussendlich folgt der indirekte Weg, welcher für eine weitere Modifikation der motorischen Impulse sorgt (Graybiel, 2000; Nambu, 2005; Obeso et al., 2008b).

1.2.3. Dysfunktion der Basalganglien im Rahmen des Morbus Parkinson

Die Funktionalität der Basalganglien wird erheblich durch den Verlust der dopaminergen Projektionen der SNc und die absolute Abnahme des Dopamins im Striatum gehemmt. Sowohl der direkte als auch der indirekte vom Striatum ausgehende Weg wird gestört. Wenn die inhibitorische Modulation des Striatums beim indirekten Weg wegfällt, dann wird der GPe vom Striatum gehemmt, dieser kann den GPi nicht mehr hemmen, der GPi wird überaktiv und hemmt den Thalamus überschießend. Und auch wenn der direkte Weg eingeschränkt abläuft, wird die Aktivität des GPi gesteigert und der Thalamus gehemmt, womit die exzitatorische Beeinflussung der Motorik wegfällt. Es fallen also die negative Beeinflussung des indirekten, inhibierenden Weges und die positive Beeinflussung des direkten, exzitatorischen Weges weg.

Ähnlich scheint es sich auch mit den kortikostriatalen Verknüpfungen zu verhalten, weshalb es generell zu einer Reduktion der kortikalen Afferenzen kommt (Mallet et al.,

2006). Durch den Wegfall der durch D2-Rezeptoren auf Interneurone generierten Impulsreduktion kommt es zu einem Überwiegen der cholinergen Interneurone, die eine Reduktion des kortikalen Inputs und eine Verschlechterung des gestörten Zustandes bedingen (Surmeier et al., 2007). Anfangs kann der Reduktion des Dopamins noch durch eine Steigerung der D2-Rezeptoren-Dichte entgegengewirkt werden, später reicht dieser Mechanismus jedoch nicht mehr aus und es kommt zu einem funktionellen Hypercholinismus (Duvoisin, 1967; Obeso et al., 2008b).

Und auch der STN wird in seiner Funktionalität aufgrund seiner Verbindungen zum GPe und GPi gestört. Anfangs kann er die verminderte Aktivität des GPe durch seine exzitatorische Funktion auf den GPe noch ausgleichen, doch später versagt diese Fähigkeit im Laufe der Erkrankung. Kompensatorisch steigert sich die Aktivität des STN, was zu einer Verstärkung des Ungleichgewichts in der Funktion des Basalganglien führt und die Bewegungsbildung weiter erschwert (Obeso et al., 2008b).

Summierend kommt es also zu einer Hemmung des direkten Weges und zu einer Steigerung des indirekten Weges mit Verringerung des kortikalen Inputs, was ein Ungleichgewicht in Richtung des indirekten Weges bezogen auf die Aktivität des Striatums nach sich zieht (Nambu, 2005). Dies erklärt die Unfähigkeit der Parkinsonpatienten, bewusst adäquate Bewegungen auszuführen bzw. in fortgeschrittenem Stadium überhaupt Bewegungen auszuführen (Nambu, 2005; Surmeier et al., 2007).

Die beschriebenen Verbindungen zum limbischen System erklären ihrerseits die Auswirkungen auf die kognitiven und psychischen Fähigkeiten (Grace, 2008).

Die Zusammenhänge sind in der **Abbildung 2** noch einmal schematisch dargestellt.

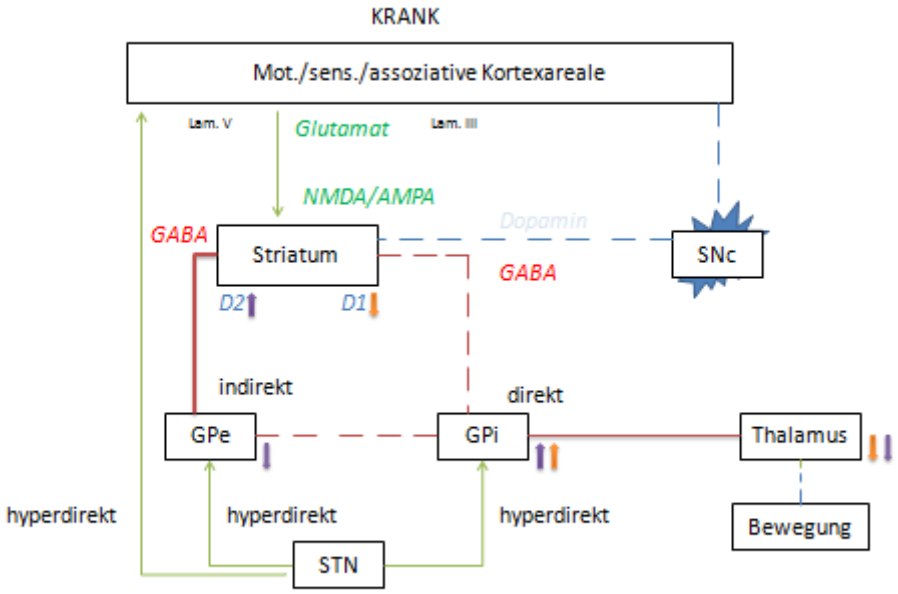

Abbildung 2: Schema zur Vernetzung der Basalganglien beim Kranken. Erregende Verbindungen sind grün und mit Pfeilspitzen, hemmende Erregungen sind rot und ohne Pfeilspitzen, dopaminerge Verbindungen sind blau und nachlassender Einfluss durch gestrichelte Linien dargestellt. Mot.= motorische, sens.= sensible, SNc= Substantia nigra pars compacta, GPe= Globus pallidus externus, GPi= Globus pallidus internus, STN= Nucleus subthalamicus. Pfeil nach oben=gesteigerte Aktivität, Pfeil nach unter=verminderte Aktivität, gelb=direkter Weg, violett=indirekter Weg

1.3. Therapiemöglichkeiten des Morbus Parkinson

Es gibt verschiedene Möglichkeiten den Morbus Parkinson zu therapieren, doch da die Ursache für den Untergang der dopaminergen Neurone noch nicht gefunden wurde, kann dieser therapeutisch nicht aufgehalten werden und die Therapien beschränken sich letztendlich auf symptomatische Ansätze. Therapeutisches Ziel müsste eigentlich sein, die Dopamin-Wirkung zu steigern oder dem Hypercholinismus entgegenzuwirken. Um die Dopamin-Wirkung zu verstärken, gibt es die Möglichkeit der Gabe von der Dopaminvorstufe L-Dopa, von Dopaminrezeptoragonisten oder den Abbau des Dopamins zu verhindern. Den Hypercholinismus bzw. die Überaktivität bestimmter Hirnregionen kann man mit operativ-ablativen Eingriffen an überaktiven Hirnarealen therapieren, durch direkt platzierte Elektroden in das Pallidum oder den STN, durch Glutamat-Rezeptor-Antagonisten, Acetylcholinrezeptor-Antagonisten (Anticholinergika) oder in experimenteller Form mithilfe von intrastriatal injizierten Inhibitoren der Acetylcholinfreisetzung wie Botulinum-Neurotoxine.

Neben den pharmakologischen und operativen Therapieoptionen spielen auch auch allgemeine Maßnahmen wie Krankengymnastik, Logopädie oder diätetische Handlungen eine große Rolle in der Therapie des Morbus Parkinson. Zu den diätetischen Maßnahmen gehört unter anderem eine Reduktion der neutralen Aminosäuren, da diese zum Beispiel mit L-Dopa um Transporter in der Blut-Hirn-Schranke konkurrieren (Eggert et al., 2012; Müller, 2012).

1.3.1. Verwendung der Dopamin-Vorstufe L-Dopa

Bei einem Dopaminmangel scheint die Gabe von Dopamin naheliegend zu sein. Dopamin passiert jedoch nicht die Blut-Hirn-Schranke. Daher muss auf die hirngängige Vorstufe L-3,4-Dihydroxphenylalanin – kurz L-Dopa – zurückgegriffen werden. Die verbliebenden Neurone der SNc und Gliazellen können diese Vorstufe mit Hilfe der Dopa-Decarboxylase in Dopamin umwandeln. Somit steigt zentral in den verbliebenden Neuronen des Striatums die Menge an Dopamin und die motorische Symptomatik geht zurück (Calne und Sandler, 1970; Müller, 2012). Jedoch gibt es auch außerhalb des ZNS Dopa-Decarboxylasen, die die im Striatum ankommende Menge an L-Dopa reduzieren, sodass eine hohe Menge an L-Dopa gegeben werden muss. Zudem bedingt das peripher durch die Decarboxylasen in Dopamin umgewandeltes L-Dopa eine Reihe von vegetativen Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen (Clarke, 2002). Eine zusätzliche Gabe von nicht hirngängigen Decarboxylasehemmern wie Carbidopa oder Benserazid im Verhältnis von 4:1 minimiert diese periphere Umwandlung und reduziert die notwendige Menge an L-Dopa um das drei- bis vierfache. So kann die Nebenwirkungsrate erheblich gesenkt werden (Eggert et al., 2012).

Am Anfang der Therapie steht die bis zu Jahre andauernde sogenannte „Honeymoon-Phase“, da das L-Dopa anfangs sehr gut verträglich ist und die Symptomatik fast gänzlich verschwindet. Später treten jedoch leider sogenannte „wearing off effects“ auf, also eine immer kürzer werdende Wirkdauer des Medikaments, gepaart mit motorischen Anomalien wie Dyskinesien, Dystonien und Wirkfluktuationen. Diese Wirkfluktuationen werden auch On/Off-Fluktuationen genannt, weil es zum unvorhersehbaren Wechsel zwischen erhöhter Mobilität und gegenteiligem Effekt kommt. Diese auftretenden Probleme nehmen mit der Dauer der Therapie mit L-Dopa zu und haben schließlich dazu geführt, dass es nur noch bei schweren Stadien oder sehr

alten Patienten eingesetzt wird (Clark, 2002). Als Ursache für das Nachlassen der Wirkung des L-Dopas wird die im Laufe der Erkrankung nachlassende Anzahl funktionierender dopaminerger Neurone angenommen. Die weiteren motorischen Anomalien werden mit der tonischen und unphysiologischen Bereitstellung von Dopamin durch dauerhaften Einsatz von L-Dopa erklärt, die das physiologische Aktivierungsniveau der Basalganglien ändern (Grace, 2008). Weiterhin kann durch verschiedene, zum Teil widersprüchliche Studien ein gewisses neurotoxisches Potenzial bei dauerhafter L-Dopa-Therapie nicht ausgeschlossen werden, was die ohnehin schon ablaufende Degeneration nigraler Neurone noch beschleunigen könnte (Müller, 2012).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Therapie des Parkinsons mit L-Dopa anfangs zwar hervorragende Ergebnisse liefert, dauerhaft jedoch zu vielen Nebenwirkungen führt.

1.3.2. Verwendung von Dopaminrezeptoragonisten

Dopaminrezeptoragonisten sind chemisch synthetisierte Substanzen, die biochemisch dem Dopamin ähneln und ohne vorherige Umwandlung an dessen postsynaptische Rezeptoren andocken können. Vorteil ist, dass dieser Vorgang unabhängig von den dopaminergen Neuronen des Striatums geschieht, also nicht auf funktionierende Neurone angewiesen ist (Müller, 2012). Es gibt Ergot-Derivate und Non-Ergot-Derivate. Die Wirkung entspricht ungefähr der des L-Dopa, jedoch mit wesentlich geringerer Effektivität. Daher muss im Laufe der Erkrankung nach 2-5 Jahren meist doch auf L-Dopa zurück gegriffen werden, um die Symptome auch weiterhin zufriedenstellend kontrollieren zu können (Antonini et al., 2009). Und auch die Nebenwirkungen wie Schwindel, Übelkeit und Erbrechen lassen nur eine langsame Steigerung der Dosis zum Optimum zu (Müller, 2012). Gefürchtete Nebenwirkungen, vor allem der Ergot-artigen Dopaminrezeptoragonisten wie Lisurid und Pergolid, sind zudem die Ausbildung von Herzklappen-, Lungen- oder Retroperitonealfibrosen und Entzugserscheinungen nach Abbruch der Therapie (Oertel et al., 2011; Rabinak und Nirenberg, 2010; Tintner et al., 2005). Diese Entzugserscheinungen können sich in Schmerzen, Angstzuständen, erhöhtes Suchtverhalten und anderen Verhaltensauffälligkeiten äußern. Ergot-artige Dopaminrezeptoragonisten stellen daher nur Mittel der 2. Wahl dar, bevorzugt werden

neuere, Non-Ergot-artige Substanzen wie Pramipexol oder Ropinirol verwendet (Oertel et al., 2011). Ziel ist dabei vor allem die Wirkung am D2-Rezeptor.

Resümierend stellen also auch die bisher bekannten Dopaminrezeptoragonisten keine optimale Therapiealternative dar.

1.3.3. Verwendung von Inhibitoren des Dopaminabbaus

Es gibt zwei wichtige Abbauenzyme des Dopamins, die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und die Monoaminooxidasen (MAO). Die gleichzeitige Gabe von L-Dopa und COMT-Inhibitoren wie Tolcapon und das nur peripher wirksame Entacapon verringert die notwendige Dosis des L-Dopas und kann so die Nebenwirkungsrate effektiv senken (Müller, 2012; Oertel et al., 2011). Bei den Monoaminooxidasen gibt es zwei Typen, den zentral vorkommenden Typ B und den peripher vorkommenden Typ A. Die selektive Hemmung des Typ B durch Selegilin oder Rasagilin erhöht die im synaptischen Spalt der striatalen Neurone zur Verfügung stehende Menge an Dopamin (Oertel et al., 2011). Jedoch nimmt mit steigender Dosis die Selektivität ab, wodurch auch der Typ A gehemmt wird und vegetative Nebenwirkungen wie Blutdruckstörungen auftreten können (Müller, 2012). Theoretisch gesehen existieren auch selektive Inhibitoren der MAO-A, diese spielen in der Therapie des Morbus Parkinson jedoch keine Rolle.

1.3.4. Therapie des Morbus Parkinson mittels Ablation

Vor Aufkommen der Therapie mit L-Dopa versuchte man in den 1940ern bis 1950ern Jahren den Morbus Parkinson durch ablative Verfahren zu therapieren. Bei dieser Therapie unterscheidet man Pallidotomien von Thalamotomien. Mit Aufkommen von L-Dopa gerieten diese Therapien aufgrund des hohen Operationsrisikos in den Hintergrund, jedoch treten sie seit den 1980ern durch die Etablierung stereotaktischer Operationsverfahren und der hohen Nebenwirkungsrate der Pharmakotherapie wieder mehr ins Interesse der Öffentlichkeit (Chao et al., 2007). Ziel der Pallidotomie ist die chirurgische Entfernung des überaktiven GPi, was vor allem zur Besserung der Akinese und der Rigidität führt (Lozano et al., 1995). Postoperativ können jedoch eine Verschlechterung einer bestehenden Demenz, Depressionen oder Persönlichkeitsveränderungen auftreten (Lang et al., 1997). Ziel der Thalamotomie ist

die effektive Therapie des Tremors, jedoch bleiben die weiteren motorischen Symptome unbeeinflusst. Postoperativ können Sprach- oder kognitive Störungen auftreten (Chao et al., 2007).

Operative Verfahren verfügen also über nicht zu unterschätzende Risiken, könnten jedoch in naher Zukunft bei weiter verbesserten stereotaktischen Verfahren eine Renaissance erfahren.

1.3.5. Anwendung der tiefen Hirnstimulation

Die tiefe Hirnstimulation oder auch „deep brain stimulation“ (DBS) ist ein spezielles, operatives Verfahren in der Therapie des Morbus Parkinson, bei der kleine Elektroden stereotaktisch ins Gehirn vor allem in den STN eingebracht werden. Ziel ist also im Gegensatz zur ablativen Therapie nicht die direkte Schädigung der überaktiven Regionen der Basalganglien, sondern eher eine Verminderung der Aktivität durch Stromimpulse. Diese Stromimpulse werden durch einen externen Generator erzeugt und sind fein steuerbar, sodass eine individuelle Anpassung möglich ist. Daher ist die DBS mit wesentlich weniger Nebenwirkungen verbunden als die Ablation und minimiert die invasiven Schäden am Hirngewebe (Montgomery, 1999). Die DBS reduziert die Parkinson-typische Symptomatik effektiv und ist bei einem selektierten Patientenkollektiv der alleinigen Pharmakotherapie überlegen (Weaver et al., 2009). Trotzdem bestehen wie bei allen invasiven Hirn-Operationen auch weiterhin die Risiken einer subkortikalen Blutung, einer Lungenembolie oder von Infarkten, die mitunter tödlich enden können (Umemura et al., 2003).

1.3.6. Verwendung von NMDA-Antagonisten

NMDA-Antagonisten wie Amantadin sind nicht kompetitive Antagonisten an den Rezeptoren des Glutamats und können so überaktive Hirnareale hemmen. Sie besitzen darüber hinaus auch eine anticholinerge Wirkkomponente. Sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Substanzen wurde eine Reduktion der motorischen Kardinalsymptome bewiesen. In Frühstadien kann sogar die dopamimetische Therapie hinausgezögert werden. Auch Bupidin hat NMDA-antagonistische Eigenschaften und

wirkt sich positiv auf den Tremor aus, jedoch zählt es wegen möglicher QT-Zeit-Verlängerung als „third line"-Therapie (Oertel et al., 2011).

1.3.7. Verwendung anticholinerg wirksamer Substanzen

Anticholinergika in der Parkinson-Therapie wie Biperiden oder Bornaprin sind Antagonisten an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren im Striatum. Ziel ihrer Applikation ist die Reduktion des oben beschriebenen Hypercholinismus und Ausgleich des Ungleichgewichts zwischen Dopamin und Acetylcholin. Anticholinergika stellen die älteste Therapieoption dar. Im Tierversuch mit Atropin als Anticholinergikum konnte eine Reduktion der Bewegungsarmut festgestellt werden. Anticholinergika können systemisch sowohl als Monotherapie verwendet werden, um die Gabe von L-Dopa hinauszuzögern, oder als Kombinationstherapie mit L-Dopa zur Reduktion der Bewegungsarmut und des Tremors (Brocks, 1999; Oertel et al., 2011).

Allerdings ist Acetylcholin ein wichtiger Transmitter des Vegetativums, sodass vor allem die systemische Gabe von Anticholinergika eine Vielzahl von vegetativen Nebenwirkungen nach sich zieht. So kann es zu Mundtrockenheit, Obstipation, Schluckstörungen, Harnverhalt, Tachykardien, Sehstörungen, Schwindel, Übelkeit und kognitiven Störungen kommen (Clarke, 2002). Durch Hemmung anderer cholinerger Hirnstrukturen werden zudem Koordinationsprobleme verursacht und das Beschwerdebild wird u. U. verschlechtert (Bohnen und Albin, 2011). Eine nur lokal wirksame, anticholinerge Therapie wäre viel besser, zum Beispiel durch die Applikation des Inhibitors der Acetylcholinfreisetzung Botulinum-Neurotoxin-A (BoNT-A) ins Striatum. Beim Parkinson-Modell der Ratte konnten auf diese Weise schon erste vielversprechende Erfolge erzielt werden (Wree et al., 2011).

1.4. Botulinum-Neurotoxine

1.4.1. Allgemeines, Aufbau und Funktionsweise von Botulinum-Neurotoxinen

„Botulismus“ ist eine heute eher selten gewordene Intoxikation v.a. durch verdorbene Lebensmittel in Konservendosen, in denen sich Clostridien vermehren können und in der sauerstoffarmen Atmosphäre der Konserve Botulinum-Neurotoxine produzieren. Der lateinische Begriff „botulus“ bedeutet Wurst, da verdorbene Wurstkonserven die häufigste Toxinquelle darstellten. Die verantwortlichen Exotoxine sind mit einer LD50 von 0,001 mg pro Kg KG die giftigsten bekannten, natürlichen Substanzen (Schantz und Johnson, 1992; Gill, 1982; Robert Koch Institut, 2007) und werden durch das grampositive und obligat anaerobe Bakterium *Clostridium botulinum, barati, butyricum* oder *argentinense* produziert (Chaddock und Marks, 2006 ; Schiavo et al., 2000).

Die akute Intoxikation äußert sich mit einer an den Extremitäten beginnenden Muskelschwäche, Mattig- und Müdigkeit, gastrointestinalen Beschwerden wie Schluckstörungen, Sehstörungen, Schwindel, Hypotonie und gestörte Speichelproduktion.

Da das Gift früh die kleinen Augenmuskeln angreift, fallen oft als erstes die Sehstörungen auf. Bei Ausbreitung auf die Atemhilfsmuskulatur kann es zum Atemstillstand und Tod kommen. Wenn man die sehr gefährliche Intoxikation jedoch überlebt, dann bilden sich alle Symptome vollständig zurück (Critchley, 1991; Dickson, 1918).

Neben dieser nahrungsmittelinduzierten Form gibt es auch noch drei weitere Formen des Botulismus, nämlich den infantilen Botulismus durch Besiedlung des kindlichen Darms mit Clostridien, den Wundbotulismus und den iatrogen verursachten Botulismus bei Therapien mit dem Neurotoxin.

Die ursächlichen Toxine kann man anhand der unterschiedlichen Wirkung auf Antiseren in 9 Gruppen einteilen, BoNT-A, -B, -C1, -C2, -D, -E, -F, -G und H. Das Clostridium produziert das Toxin als Vorstufe, die posttranslational am N-terminalen Ende in zwei unterschiedlich große Ketten geteilt wird. Die N-terminale, mit 50 kDa leichte Kette (light chain, LC) und die C-terminale mit 100 k Da schwere Kette (heavy chain, HC) bleiben aber durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Bei oraler Aufnahme wird das Toxin als Komplex mit nicht-toxischen Hämagglutininen und anderen

Proteinen vor dem sauren Milieu des Magens geschützt. Erst im alkalischen Milieu des Dünndarms lösen sie sich die Komplexe wieder und die Toxine werden durch Autolyse freigesetzt (Oguma et al., 1995; Schiavo et al., 2000).

Der weitere Vorgang der Intoxikation kann nur durch die HC realisiert werden, ohne die die LC nicht zu ihrer Zielstruktur gelangt. Solange die LC und die HC noch verbunden sind, liegt das katalytische Zentrum der LC nicht frei und die LC ist inaktiv, erst nach Trennung der beiden Ketten kann die LC aktiv werden. Das C-terminale Ende der HC vermittelt die Bindung an die Zielstrukturen. So werden bei allen BoNT zum einen die Ganglioside der präsynaptischen Zielmembran gebunden und zum anderen wird über diese Domäne eine für die verschiedenen BoNT spezifische Bindung an bestimmten Rezeptoren ermöglicht (Breidenbach und Brunger, 2004; Chaddock und Marks, 2006; Schiavo et al., 2000; Verderio et al., 2006). Diese Rezeptoren sind Proteine der Vesikelmembran, die in besonders hoher Dichte in hoch aktiven Neuronen vorkommen, sodass diese besonders gefährdet sind. Hier unterscheiden sich die BoNT hinsichtlich ihres bevorzugten Rezeptors. So binden BoNT-A, -D, -E, -F an SV2 (synaptisches Vesikelprotein 2), wohingegen BoNT –B und –G an Synaptotagmin I und II binden (Dong et al., 2006, 2008; Fu et al., 2009; Mahrhold et al., 2006; Nishiki et al., 1996; Peng et al., 2011; Rummel et al., 2004, 2009). Nach Bindung an diesen Rezeptor folgt die Endozytose und das Gift gelangt in die Nervenzelle. Nun wird das N-terminale Ende der HC in die hydrophobe Ebene der Vesikelmembran eingelagert, sodass sich eine Pore bilden kann, die LC das Vesikel verlässt und ins Zytosol gelangt. Während dieser Entfaltung wird durch Reduktion die verbindende Disulfidbrücke getrennt und das katalytische Zentrum der LC wird frei, sodass endlich der SNARE-Komplex gespalten werden kann (Rossetto et al., 2013; Schiavo et al., 2000).

Die LC funktioniert als Zink-Endoprotease, welche jeweils unterschiedliche Bestandteile des SNARE-Komplexes an je einer Peptidbindung spaltet. Sie sind bei allen BoNT strukturell grundsätzlich ähnlich aufgebaut. SNARE steht für „soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“ und 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). Diese Proteine sind jeweils die Angriffspunkte für die LC der verschiedenen BoNT und spezifisch für bestimmte einzelne Toxine. So wird SNAP-25 nur von BoNT-A, -

C und –E, Synaptobrevin nur von -B, -D, -E und -G und Syntaxin als einziges noch zusätzlich von -C gespalten. Ein intakter SNARE-Komplex ist wichtig für die Vesikelfusion bzw. Exozytose, also die Verschmelzung von Vesikeln mit präsynaptischen Membranen zur Freisetzung von Transmittern in den synaptischen Spalt. Er stellt die Verbindung zwischen Vesikel und postsynaptischer Membran dar. BoNT ist relativ spezifisch für Motoneurone und hemmt auf diesem Weg die Freisetzung von Acetylcholin, sodass die Muskelfunktion gestört wird und die oben beschriebene Muskelschwäche folgt.

Die toxische Eigenschaft der Toxine beruht dabei auf einer Hemmung der Acetylcholinfreisetzung von Motorneuronen an den muskulären Endplatten. Muskuläre Endplatten stellen Sonderformen von Synapsen im peripheren Nervensystem dar, an denen eine cholinerge Signalweiterleitung von einem Motorneuron an eine Muskelfaser erfolgt. Bei einer Vergiftung mit einem BoNT kommt es zum Ausfall der Skelettmuskulatur und im schlimmsten Fall zum Tod durch Atemlähmung, da die cholinerge Signaltransduktion in der Peripherie von den Motorneuronen zu den Muskeln nicht mehr erfolgen kann. Die Funktionsweise des Gifts ist in **Abbildung 3** schematisch dargestellt (Rossetto et al., 2013; Schiavo et al., 2000; Verderio et al., 2006).

In der Regel beschränkt sich die Wirkung der BoNT auf das periphere Nervensystem, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können. Jedoch lassen sich diese Toxine auch direkt ins Gehirn injizieren und sind dann auch im ZNS wirksam (Luvisetto et al., 2003; Verderio et al., 2006, Wree et al., 2011).

Die Wirkungen der BoNT sind vielfältig. So wird nicht nur das cholinerge System beeinflusst, sondern in höheren Konzentrationen auch die Freisetzung anderer Neurotransmitter (Bigalke et al., 1981, 1985).

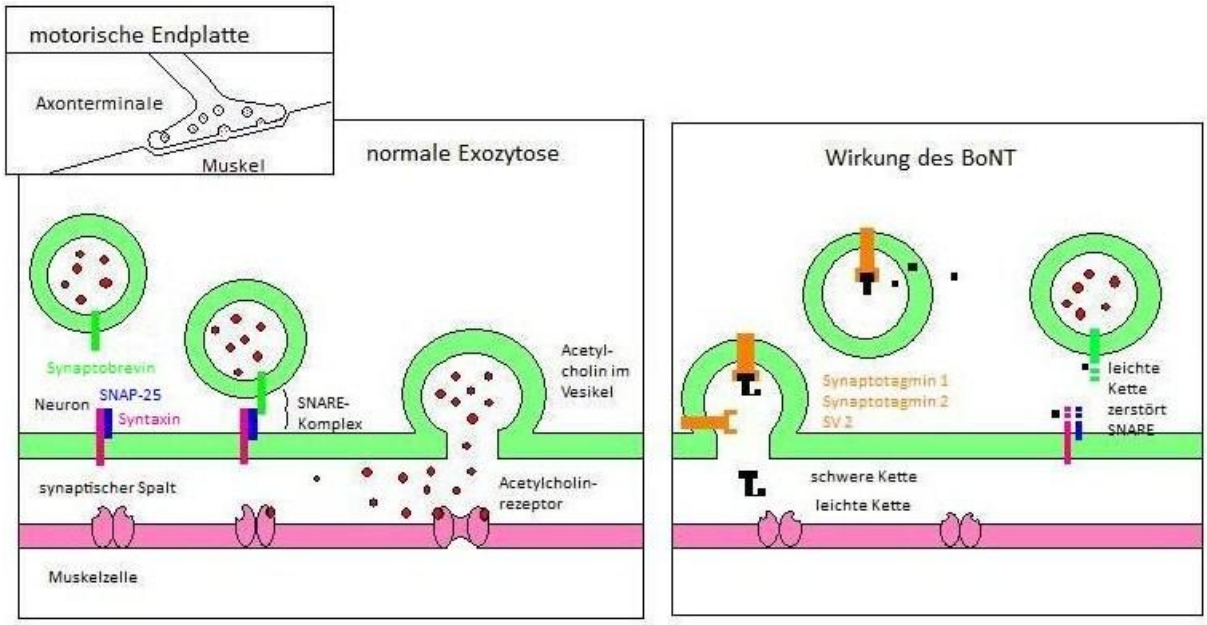

Abbildung 3: Funktionsweise des BoNT. Normalerweise stellt bei der motorischen Endplatte der aus Synaptobrevin, SNAP-25 und Syntaxin bestehende SNARE-Komplex die Verbindung des mit Acetylcholin gefüllten Vesikels zur präsynaptischen Membran her, sodass der Transmitter ausgeschüttet wird und an den Rezeptoren der Muskelzelle zu einer Bewegung führen kann. Im Falle einer Vergiftung wird das aus einer leichten und einer schweren Kette bestehende BoNT mithilfe von Synaptotagmin 1 und 2 und SV2 aus dem synaptischen Spalt in die Axonterminale aufgenommen, die Ketten werden getrennt und das katalytische Zentrum der leichten Kette kann den SNARE-Komplex zerstören, sodass eine Fusion des Vesikels mit der präsynaptischen Membran und damit eine Bewegung nicht mehr möglich ist.

1.4.2. Botulinum-Neurotoxine als Therapieoption

1.4.2.1. Therapie der Dystonie

Dystonien sind unfreiwillige, unregelmäßige oder anhaltenden überschießende Muskelkontraktionen. Zum Teil entstehen normale Bewegungsabläufe, zum Teil werden aber auch antagonisierende Muskeln mit kontrahiert, was zu abnormen, verdrehten Haltungen oder steifen, langsamen Bewegungen führt. Die betroffenen Patienten sind in ihrer muskulären Funktionalität eingeschränkt und von erheblichen Schmerzen geplagt. Je nach beteiligten Muskeln variiert das Erkrankungsbild und man unterscheidet fokale von segmentalen, multifokalen und generalisierten Dystonien. Fokale Dystonien betreffen nur eine Körperregion, vor allem den Hals (cervicale Dystonien, CD), während segmentale Dystonien mehrere benachbarte Körperregionen, multifokalen Dystonien mehrere nicht benachbarte Körperregionen und generalisierte Dystonien großflächige Regionen betreffen (Neychev et al., 2011; Standaert, 2011).

Ähnlich wie beim Morbus Parkinson ist die genaue Ursache der Erkrankung unklar und die Basalganglien werden als Ausgangspunkt der motorischen Symptome diskutiert. Weiterhin stehen Schäden am Hirnstamm, Kleinhirn, zum Kleinhirn führende

Afferenzen, Stoffwechselerkrankungen oder genetische Ursachen im Blickpunkt. Zu den genetischen Ursachen zählen Mutationen von am Dopaminstoffwechsel beteiligten Proteinen (Neychev et al., 2011; Standaert, 2011).

Dementsprechend stellen die therapeutischen Interventionen der Dystonie wie beim Morbus Parkinson meist nur symptomatische (und nicht kausale) Ansätze dar. Auch hier werden therapeutisch sehr gut wirksame orale Anticholinergika eingesetzt, die jedoch durch die systemische Wirkung erhebliche Nebenwirkungen mit sich bringen (siehe 1.3.7). Um diese zu verhindern, wurden schon in den 1980ern lokale Therapieformen wie BoNT-Injektionen versucht, sodass die Bedeutung von oralen Anticholinergika wesentlich abnahm (Jankovic, 2013).

Ziel der lokalen Therapie mit BoNT ist die Ausschaltung überaktiver Muskeln, die vorher elektromyografisch aufgesucht wurden. Die lokale, individual- und muskelspezifische BoNT-Therapie ist der klassischen Therapie mit Anticholinergika hinsichtlich Symptomreduktion und Nebenwirkungsrate wesentlich überlegen (Costa et al., 2005a, b). Trotzdem können auch bei lokaler BoNT-Injektion anticholinerge Nebenwirkungen wie Schluckstörungen oder Schwäche der Halsmuskulatur auftreten (Brashear et al., 2000). Sie sind dosis- und verteilungsabhängig und können durch Gabe mehrerer kleiner Dosen reduziert werden (Borodic et al., 1994).

1.4.2.2. Kosmetischer Einsatz von BoNT

Die Verwendung von BoNT, vor allem unter dem Handelsnamen „Botox“ für kosmetische, vor allem verjüngende Eingriffe am Gesicht, ist in den letzten zehn Jahren gestiegen. Faziale Alterserscheinungen werden vor allem durch Falten und Altersflecke verursacht. Falten entstehen, wenn aufgrund der Schwerkraft und nachlassender Elastizität des Gewebes im Alter eine relative Überaktivität der Muskulatur resultiert, und verlaufen im rechten Winkel zu den Muskelfasern. Mittels lokaler Injektion von BoNT können die überaktiven Muskeln gelähmt und der Faltenbildung entgegengewirkt werden. Die Wirkung hält ungefähr vier Monate an, da das Gift langsam abtransportiert und verstoffwechselt wird (Jaspers et al., 2011).

1.4.2.3. Therapie der Epilepsie

Botulinum-Neurotoxine beeinflussen nicht nur das cholinerge, sondern auch andere Transmittersysteme (siehe 1.4.1.). So zum Beispiel auch die Freisetzung von Glutamat, was BoNT als mögliches Therapeutikum von Epilepsien attraktiv macht (Antonucci et al., 2009). Im Tierversuch kann man mithilfe der Kainsäure das Bild einer Temporallappenepilepsie histopathologisch und klinisch nachbilden. Die die Temporallappenepilepsie kennzeichnenden hippocampalen Neuronenuntergänge werden durch die Exzitotoxizität der Kainsäure verursacht (Suzuki et al., 1995). Auch die anfallstypischen Potenziale des läsionierten Hippocampus lassen sich mit Ableitungselektroden im Tiermodell nachweisen (Antonucci et al., 2008). Diese ändern sich unter der Therapie mit intrahippocampal injiziertem BoNT-E wesentlich. So nehmen sowohl die Anfallsfrequenz als auch die absolute Anzahl der Anfälle und deren Dauer ab. Zusätzlich werden die durch die Kainsäure induzierten neuronalen Schäden am Hippocampus reduziert. Hierbei wird sich die der Exzitotoxizität der Kainsäure gegenteilige Wirkung des BoNT, die inhibitorische Funktion des Gifts auf Neurone, zunutze gemacht. BoNT-E ist spezifisch für SNAP-25 und hemmt die Freisetzung des exzitatorisch wirksamen Transmitters Glutamat. 21 Tage nach BoNT-Injektion ist dieser Effekt am größten und auch nur auf der Seite der Injektion nachweisbar, sodass auf der kontralateralen Seite keinerlei BoNT-Aktivität zu finden ist. Die Botulinum-Neurotoxine sind in der Epilepsietherapie hinsichtlich der Wirkung den klassischen Medikamenten wie Phenytoin in experimentellen Tierversuchen überlegen. Die für diesen Effekt benötigte Dosis verursacht bei den Versuchstieren keine Intoxikationserscheinungen, nur Lernschwierigkeiten können kurz nach der Applikation auftreten, sind jedoch wie auch jede andere Wirkung des BoNT nur von kurzer Dauer (Antonucci et al., 2009; Constantin et al., 2005).

1.4.2.4. Neuroprotektion bei ischämischen Schlaganfällen

Bei Schlaganfällen kommt es in ischämischen Regionen zu einer überschießenden Ausschüttung von Glutamat. Am Anfang eines jeden ischämischen Schlaganfalls steht die Reduktion der Blutversorgung eines Gehirnareals mit nachfolgender Hypoxie, sodass die zelluläre Energieversorgung und die Funktion aktiver Ionentransporter gestört werden. Bei Zusammenbruch dieser Ionenkanäle kommt es zur Depolarisation der Zelle, die spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle öffnet und zu einer Freisetzung verschiedener

Neurotransmitter v.a. Glutamat führt. Das in den synaptischen Spalt freigesetzte Glutamat akkumuliert dort und wird aufgrund des Energiemangels aktiv abtransportierender Systeme auch nicht abgebaut. Zusätzlich werden weitere Gewebeschäden hervorgerufen, da das intrazelluläre Calcium proteolytische und Radikale-produzierende Systeme aktiviert. Das im synaptischen Spalt akkumulierende Glutamat bindet an metabotrope Glutamatrezeptoren, sodass ein Einstrom von Natrium-, Calcium- und Chloridionen folgt. Das einströmende Calcium führt dazu, dass das Kaliumgleichgewicht gestört wird, da der Einstrom von Natrium und Chlorid den Ausstrom des Kaliums übersteigt, sodass sowohl die depolarisierende Wirkung vorangetrieben als auch das osmotische Milieu der Zelle gestört wird. Der resultierende Wassereinstrom und das resultierende Gewebeödem komprimieren das umliegende Gewebe, sodass auch dieses in seiner Funktion gestört und der Gewebeschaden verstärkt wird (Dirnagl et al., 1999).

Im Tiermodell lässt sich der Zustand eines ischämischen Schlaganfalls nachbilden. Durch die intrazerebrale Injektion des vasokonstriktorisch wirkenden Endothelin-1 wird die Blutversorgung eines Hirnareals reduziert und letztendlich ein Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration hervorgerufen (Bogaert et al., 2000). Durch die Injektion von BoNT-E in die durch Endothelin-1 geschädigte Hirnregion konnte die Glutamat-Freisetzung in diesem Tiermodell reduziert werden. Der oben beschriebene Teufelskreis wird unterbrochen und das durch einen ischämischen Schlaganfall geschädigte Gewebe wird letztendlich reduziert (Antonucci et al., 2010).

1.4.2.5. Schmerztherapie und weitere Einsatzmöglichkeiten

Durch Beeinflussung des SNARE-Komplexes sind BoNT auch zur Therapie von Schmerzen auf spinaler Ebene geeignet (Chaddock et al., 2004). Eine Vielzahl von Mediatoren ist an der Schmerzverarbeitung beteiligt, so auch die durch einen SNARE-vermittelten Sekretionsprozess freigesetzte Substanz P. Durch BoNT-Injektion in die entsprechenden nozizeptiven Afferenzen kann so die Schmerzweiterleitung zum Teil unterbunden werden (Dray et al., 1994; Welch et al., 2000). Um jedoch nur die nozizeptiven und keine anderen Afferenzen zu blockieren, muss die Endoprotease-Untereinheit der BoNT mit einem speziellen Rezeptor verbunden werden. Diese Struktur bindet die Galaktose-reichen Kohlenhydrate der nozizeptiven Afferenzen

selektiv. Ziel ist eine langanhaltende, bis zu einigen Monaten andauernde Schmerzunterdrückung (Chaddock et al., 2004), die heute schon in Therapie der Fibromyalgie, beim temporomandibulären Schmerzsyndrom, bei Epikondylitis oder dem Thoracic-Outlet-Syndrom Verwendung findet (Benecke et al., 2003) und bei Migräne und Spannungskopfschmerz erprobt wird (Naumann et al., 2008). So reduziert BoNT-A die Anzahl an Tagen mit Kopfschmerzen pro Monat bei Patienten mit chronischer Migräne und täglichen Kopfschmerzen im Vergleich zu Placebo (Jackson et al., 2012). Der große Vorteil der Verwendung von BoNT im Vergleich zu klassischen Analgetika ist ihre einzigartige, wesentlich länger andauernde Wirkung von 3-6 Monaten nach einmaliger peripherer Applikation, was gerade bei chronischen Schmerzen Bedeutung hat. Zusätzlich würden durch klassische Analgetika induzierte Nebenwirkungen entfallen (wie zum Beispiel Obstipation bei Opioiden oder gastrointestinale Blutungen bei NSARs) ebenso wie Toleranzentwicklung (Matak et al., 2014).

Weiterhin kann das BoNT-A zur Therapie von vegetativen Störungen wie Sialorrhoe, palmare oder axilläre Hyperhidrosis oder Detrusorhyperaktivität der Blase verwendet werden (Naumann et al., 2008).

1.4.2.6. Das 6-OHDA-Modell des Morbus Parkinson

Die systemische Therapie des Morbus Parkinson mit Anticholinergika zur Bekämpfung des Hypercholinismus bringt eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit oder Harnverhalt mit sich (siehe 1.3.7.). Die direkte Injektion anticholinerg wirksamer Substanzen wie BoNT in erkrankte Hirnareale und damit nur lokale Wirkung des Gifts könnte hier Abhilfe schaffen.

Ähnlich wie die Temporallappenepilepsie oder der ischämische Schlaganfall lässt sich auch beim Morbus Parkinson das Schädigungsmuster im Tiermodell nachbilden. Dazu wird das dem Dopamin in der Struktur ähnliche 6-OHDA (6-Hydroxydopamin) in das mediale Vorderhirnbündel, ins Striatum oder in die Substantia nigra injiziert. Hier wird es durch Re-Uptakemechanismen von katecholaminergen Neuronen aufgenommen. Intrazellulär angelangt wird es oxidiert, wobei die sehr stark toxischen Reaktionsprodukte Wasserstoffperoxid, Superoxid- und Hydroxylradikale sowie Parachinon anfallen und zu einem Untergang dopaminerger Neurone führen. Außerdem

gibt es Hinweise darauf, dass auch 6-OHDA selbst direkt den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette stört (Glinka et al., 1996 und 1998; Gerlach et al., 2003). Vor allem mit der Injektion in das mediale Vorherhirnbündel lässt sich ein parkinsonähnliches motorisches Schädigungsmuster imitieren (Meredith et al., 2008). Während sich das Schädigungsmuster des Morbus Parkinson bei dem natürlichen Verlauf über Jahre und Jahrzehnte entwickelt, wird es hier innerhalb weniger Stunden und Tage generiert.

Um zu überprüfen, ob die erwünschte Läsion entstanden ist, wird der Dopaminrezeptoragonist Apomorphin subcutan injiziert. Dieser bindet hauptsächlich an postsynaptischen, ipsilateralen D2-Dopaminrezeptoren striataler Neurone, welche durch den Untergang der dopaminergen Afferenzen auf der läsionierten Seite kompensatorisch hochreguliert sind. Generell bindet Apomorphin an allen D2-Rezeptoren des Gehirns, doch durch die Up-Regulation der D2-Rezeptoren auf der läsionierten Seite im Striatum kann es bei systemisch applizierter Gabe stärker auf der läsionierten Seite wirken. Auf der läsionierten Seite aktiviert das Apomorphin mehr Dopaminrezeptoren, sodass die erkrankten Tiere eine Art Drehbewegung vollziehen, die als „Rotation“ bezeichnet wird. Diese Rotationen zeigen von der läsionierten Seite weg, sodass bei einer rechtsseitigen Läsion die Drehbewegung nach links erfolgt (Ungerstedt et al., 1969; Wree et al., 2011).

1.4.2.7. Der Einsatz von Botulinumtoxinen beim 6-OHDA-Modell

In den letzten Jahren konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Wree vom Institut für Anatomie Rostock im Zusammenarbeit mit der Klinik für Neurologie Rostock zeigen, dass sich die Rate an apomorphininduzierten Rotationen pro Zeiteinheit in Hemiparkinsonratten durch die intrastriatale Injektion von BoNT in die durch 6-OHDA läsionierte (rechte) Hemisphäre reduzieren lässt. Bei Versuchsratten ist dazu eine Dosis von 1-2 ng BoNT-A nötig, höhere Dosen haben sich als toxisch erwiesen, geringere als wirkungslos. Die zentrale Wirkung des Gifts, also die Reduktion der Rotationen, hält mit bis zu 6 Monaten wesentlich länger an als bei der peripheren Anwendung. In dieser Zeit treten keine strukturellen Veränderungen auf, was die Zellzahl cholinerger Neurone und das striatale Volumens betrifft.

Dementsprechend finden sich in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen im Tierversuch keinerlei Störungen kognitiver Leistungen oder vegetativer Funktionen durch die Injektion von BoNT. Es kommt zu keiner wesentlichen Änderung des Referenzgedächtnisses im Vergleich zu unbehandelten Tieren und auch das räumliche Lernvermögen bleibt unbeeinflusst. Nur ein gering vermindertes Angstverhalten kann nach BoNT-Injektion nachgewiesen werden, was für die Therapie der Erkrankung sogar von Vorteil sein könnte, da viele Patienten an Depressionen und Angststörungen leiden. (Antipova et al., 2013; Hawlitschka, 2012; Holzmann et al., 2012).

In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe um Prof. Wree zur intrastriatalen BoNT-A-Applikation wurde stets mit Wistar Ratten gearbeitet. Da aber bekannt ist, dass sich Rattenstämme untereinander als auch Ratten und Mäuse in vielerlei Hinsicht physiologisch unterscheiden, wurde in dieser Arbeit die Wirkung von intrastriatal injiziertem BoNT-A auf C57BL/6 -Mäuse untersucht. Fraglich ist, ob auch hier die Injektion des BoNT keinerlei Toxizität hinsichtlich der Anzahl striataler Neurone mit sich bringt. Nur wenn die Integrität der Neurone ungestört bleibt, kann die intrazerebrale Injektion von BoNT z.B. zur Therapie des Parkinsons in verschiedenen Maus-Modellen in Betracht gezogen werden.

1.5. Fragestellung dieser Arbeit

Morbus Parkinson stellt nach der Alzheimer-Demenz die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar. Allein in Deutschland sind 250.000 – 400.000 Menschen erkrankt und leiden an den vielfältigen motorischen und vegetativen Symptomen (Gerlach et al., 2007). Trotz der vielen Therapieansätze gibt es bis heute keine kausal ansetzende Therapie. Die Pharmaka haben alle eine große Vielzahl an Lebensqualität einschränkenden Nebenwirkungen oder verlieren im Laufe der Zeit ihre Wirksamkeit. Durch intrazerebrale Injektion des BoNT-A könnten diese Nebenwirkungen bei ausgezeichneter Reduktion Parkinson-typischer Beschwerden umgangen werden. Obwohl Botulinum-Neurotoxine mit einer LD50 von 0,001 mg/ kg KG die giftigsten natürlichen Substanzen darstellen, könnten sie als neue Therapieoption des Morbus Parkinson von Bedeutung sein. Aktuelle Forschungsarbeiten befassen sich daher mit der zellulären Integrität striataler Neurone nach BoNT-Injektion.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es hierbei, zu klären, welche Auswirkungen die einseitige striatale Injektion von BoNT-A auf die Anzahl der cholinergen Interneurone des CPu am Tiermodell der Maus hat, um eine mögliche Zytotoxizität von BoNT für diesen wichtigen Zelltyp auszuschließen.

Dazu wurden die cholinergen (ChAT-immunreaktiven) Neurone im Caudatus Putamen von Mäusen gezählt, und zwar nach unterschiedlich langen Zeiten post injectionem und unterschiedlichen BoNT-Dosen. Zum einen sollte der Langzeiteffekt einer intrastriatalen 25 pg-BoNT-Dosis bewertet werden, zum anderen nach 3-monatigem Post-injectionem-Intervall der Effekt unterschiedlicher BoNT-Dosen.

Weitere Untersuchungen betreffen das Körpergewicht, das Gehirngewicht und das Volumen des CPu.

2. Material und Methoden

Alle Tierexperimente wurden vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt. Alle Tiere wurden gemäß den aktuellen Bestimmungen des Tierschutzes und den Auflagen der zuständigen Behörde gehalten und behandelt.

Eine ausführliche Auflistung aller verwendeter Puffer, Materialien, Geräte, Kits und Software sind in den Tabellen im Anhang zusammengefasst.

In dieser Arbeit wurden 44 männliche C57 BL/6-Mäuse verwendet, die jeweils unilateral rechts eine Injektion von 25 pg BoNT-A erhalten haben, um die Auswirkungen des Gifts auf die Anzahl cholinerger Neurone im Striatum zu untersuchen. Die Tiere wurden je nach Alter in 4 verschiedene Gruppen unterteilt, die 1 Monat, 3 Monate, 6 Monate und 9 Monate post injectionem getötet und untersucht worden sind. Als Kontrolle diente eine 5. Gruppe, die nur eine Vehikel-Substanz erhalten hat und 9 Monate alt wurde. So konnte die Anzahl der Neurone in Abhängigkeit von der Zeit nach der Injektion untersucht werden.

Zusätzlich verwendeten wir 12 Tiere mit 50pg, 100pg und 200pg BoNT-Injektion, um die dosisabhängige Wirkung des BoNT auf die Anzahl der Neurone zu untersuchen und eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erstellen. Diese Tiere gehörten alle der 6-Monats-Gruppe an.

So wurden insgesamt 56 Tiere untersucht. Eine tabellarische Zusammenfassung der untersuchten Tiergruppen zeigt **Tabelle 1**.

untersuchte Tiergruppen für Neuronenanzahl in Abhängigkeit von der Zeit post injectionem

Anzahl untersuchter Tiere	Menge BoNT	Alter der Tiere
10	25 pg	1 Mo
8	25 pg	3 Mo
8	25 pg	6 Mo
8	25 pg	9 Mo
9	0 pg	9 Mo

untersuchte Tiergruppen für Neuronenanzahl in Abhängigkeit von der BoNT-Dosis

Anzahl untersuchter Tiere	Menge BoNT	Alter der Tiere
5	50 pg	6 Mo
5	100 pg	6 Mo
2	200 pg	6 Mo

∑56

Tabelle 1: tabellarische Zusammenfassung der untersuchten Tiergruppen

2.1. Verwendete Tiere

Es wurden für die Experimente ausschließlich junge adulte männliche C57 BL/6 Mäuse verwendet, die von der Firma Charles River WIGA aus Sulzfeld, Deutschland, bezogen wurden. Die Tiere wogen zum Zeitpunkt der Tötung durchschnittlich 18-24 g. Die Tiere wurden zu fünft in Kunststoffkäfigen mit Metallgitteraufsetzen gehalten (720 cm^2 Grundfläche). Durch eine Zeitschaltuhr wurde die Beleuchtung in dem klimatisierten Tierstall (22±2°C) so reguliert, dass ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus (12h - 12h) geschaffen werden konnte. Der Zugang zu normalem Trinkwasser und Nahrung (Ssniff, Soest, Deutschland) war für die Tiere uneingeschränkt.

2.2. Narkose der Tiere

Die Versuchstiere wurden vor allen Operationen wie den Botulinumtoxininjektionen oder Scheinbotulinumtoxininjektionen mit einer Mischung aus Ketamin und Xylazin narkotisiert. Diese Mischung wurde den Tieren intraperitoneal mit einer Konzentration von 50mg/kg KG Ketamin und 4mg/kg KG Xylazin injiziert. Das Ketamin wurde von der Firma bela-pharm Vechta, Deutschland und Xylazin als „Rompun“ von Bayer bezogen.

Die gebrauchsfähige Lösung bestand aus 2,5 ml Xylazin-Lösung mit 7,5 ml Ketamin-Lösung und 90 ml 0,9%iger NaCl-Lösung.

2.3. Intrazerebrale Injektion von BoNT-A

Die Narkose der Tiere und die intrazerebrale Injektion des Gifts wurden von den Herren Prof. Wree und Dr. Mix durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die zeitliche Abhängigkeit der Neuronenanzahl 25 pg BoNT-A verwendet, während für die Dosis-Wirkungsbeziehung 50 pg, 100 pg und 200 pg genommen wurden.

Das verwendete BoNT-A entstammte der Firma List Biological Laboratories, INC. 10 µg des pulverförmigen lyophilisierten BoNT-A wurden zur Herstellung einer Stammlösung in 200 µl Phosphatpuffer (PBS) mit 0,1% BSA gelöst. Die hergestellte Lösung wurde tiefgefroren, am Injektionstag aufgelöst und auf entsprechende Konzentration verdünnt. Dazu wurde eine Zwischenlösung mit einer Konzentration von 500 pg/µl im Verhältnis 1:20, 1:10, 1:5 oder 1:2,5 mit PBS-BSA verdünnt. Es wurde immer 1µl Flüssigkeit injiziert, der entweder 25pg, 50pg, 100pg, 200pg BoNT-A oder nur Vehikel-Lösung enthielt. Um den Kopf des Tieres für die Injektion zu fixieren, wurde dieser in einem stereotaktischen Apparat in der sogenannten „Flat skull“ Stellung mithilfe eines Mausadapters verankert (Kopf©, Tujunga, CA, USA). Dazu wurden zwei Stifte in die Gehörgänge (Ear bars) eingeführt und eine Verankerung hinter die oberen zwei Inzisiven eingehakt (Tooth bar).

Es gab eine Injektionsstelle am **rechten** Striatum, die bezogen auf Bregma (Paxinos und Franklin, 2004) folgende Koordinaten aufwies:

Injektionsstelle:	frontal (longitudinal) +0,65 (von Bregma aus)
	Sagittal (trasversal) -1,6 (von Bregma aus)
	Vertikal (horizonzal) D-3,0 (von Duraaufsatzpunkt ausgehend)

Die Injektionen dauerten 4 Minuten, in Schritten von je 0,25 µl pro Minute. Nach Injektion der gesamten Menge an BoNT wurde die Injektionskanüle noch weitere 4 Minuten an Ort und Stelle belassen, um noch verbleibende Reste des Gifts diffundieren zu lassen und zu verhindern, dass durch den Rückzug der Nadel ein Reflux entsteht.

Um die rechte, BoNT-injizierte Seite an den frei flottierenden Parallelschnitten wieder zu erkennen, wurde peripher am linken Cortex ein kleines Stück weggeschnitten, so konnte schon makroskopisch die jeweilige Seite des Schnitts zugeordnet werden.

2.4. Tötung der Tiere und Fixierung ihrer Gehirne

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Herrn Prof. Wree und Dr. Mix mit einer Überdosis an Ketamin und Xylazin intraperitoneal. Dann wurden der Thorax und das rechte Herzohr eröffnet und über eine in den linken Ventrikel des Herzens eingeführte Kanüle nacheinander 10 ml einer 4°C kalten 0,9%igen Natriumchloridlösung zum Ausspülen des Blutes aus dem Gefäßsystem injiziert. Dann wurden 50 ml eines PBS (0,1 M, pH 7,4)-Paraformaldehyd (3,7%)-Gemisches in die Aorta perfundiert, um das Tier zu fixieren. Dann wurden die Gehirne entnommen und eine weitere Nacht bei 4°C in 3,7% Paraformaldehyd nachfixiert. Nun wurden die Gehirne mithilfe eines PBS-Saccharose (20%)-Gemisches für zwei Tage kryoprotektiert. Mit -50°C kaltem Isopentan wurden die Hirne 5 Minuten lang schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Tötung der Tiere erfolgte je nach Gruppenzugehörigkeit nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion von BoNT-A bzw. bei den Tieren der Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung nach 6 Monaten.

2.5. Anfertigung von histologischen Parallelschnitten der Versuchstiergehirne mittels Gefriermikrotom

Mithilfe eines Gefriermikrotoms der Firma Leica wurden durch Juliane Spiewok, meiner Mitdoktorandin, und durch mich histologische Parallelschnitte der Versuchstiergehirne erzeugt, damit diese anschießend der immunhistochemischen Färbung zugeführt werden konnten. Dazu wurden die Hirne an der Medulla oblongata auf einem Aluminium-Stempel des Mikrotoms mittels Tissue-Tek O.C.T. Compound von der Firma SAKURA Fientek Europe B.V. fixiert. Dieser Stempel wurde in den Objekthalter des Mikrotoms eingespannt und möglichst genau so positioniert, dass frontale Parallelschnitte angefertigt werden konnten. Die so erworbenen Schnitte waren 30 µm dick. Es wurden 5 Serien angelegt, wobei bei der ersten Serie die Schnitte von der Klinge

des Mikrotoms direkt auf einen Super Frost plus Objektträger (Menzel) aufgebracht wurden, während alle anderen vier Serien mit einem Pinsel in mit Kryoprotektionslösung befüllte Gewebekulturschalen der Firma Nunc überführt wurden. Diese Kryoprotektionslösung bestand aus den Komponenten PBS, Glycerol (85%) und Ethylenglykol (99%). In jedes Well passten 2 Parallelschnitte des Striatums. So wurde letztendlich der 1. Schnitt und darauffolgend jeder 5. Schnitt auf den Objektträger aufgetan bzw. äquivalent bei den Well-Platten.

Die auf den Objektträgern befindlichen Schnitte wurden nach Nissl zu Kontrollzwecken gefärbt (Kresylviolett-Färbung).

Von den anderen vier Serien wurde eine Serie gegen die Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) gefärbt, um cholinerge Neurone darzustellen, und eine gegen die Tyrosin-Hydroxylase (TH), um die katecholaminergen Neurone und deren Axone anzufärben. Die restlichen beiden Serien wurden als Reserve aufbewahrt.

Nach dem Schneiden konnten die Parallelschnitte in den Well-Platten bei -20°C bis zur Färbung in der Kryoprotektionslösung gelagert werden.

Eine schematische Übersicht über das Gehirn der Maus und deren Kortex zeigt **Abbildung 4.**

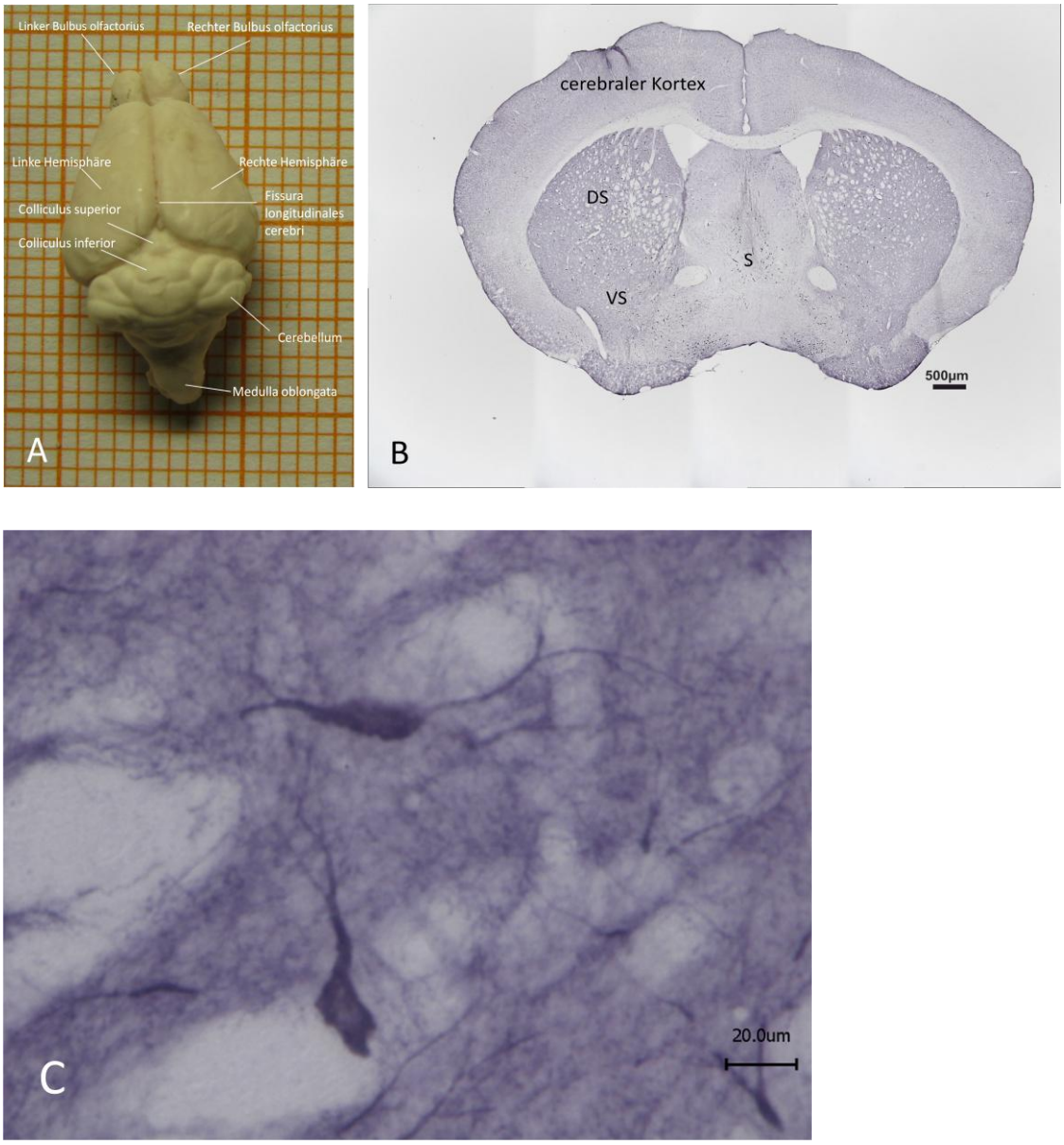

Abbildung 4: Übersicht eines Maushirns (A, Boma 335, auf Millimeterpapier) , Darstellung eines Frontalschnitts (B) und Neurone des DS in der ChAT-Färbung (C), DS= dorsales Striatum, VS= ventrales Striatum, S= Septum.

2.6. Immunhistochemische Färbung

Eine Auflistung aller verwendeter Primär- sowie Sekundär und aller anderen verwendeten Materialien befindet sich im Anhang. Die Färbungen erfolgten durch Juliane Spiewok und durch mich.

2.6.1. Anfärbung ChAT-positiver Neurone

Die Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) befindet sich im Zytosol cholinerger Neurone und stellt aus Cholin und Acetyl-CoA den Neurotransmitter Acetylcholin her. Dementsprechend markieren Antikörper gegen dieses Enzym cholinerge Neurone. Mithilfe verschiedener Antikörper wurde an insgesamt zwei Arbeitstagen gefärbt.

Tag 1

Am 1. Tag wurden zuerst die angefertigten Schnitte mit einem feinen Pinsel aus der Kryoprotektionslösung genommen und in 24-Well Gewebekulturplatten mit jeweils 2 ml PBS pro Well (0,1 M, pH 7,4) für 10 Minuten gewaschen. Dann blockte man 15 Minuten lang mithilfe einer 3%igen in PBS gelösten Wasserstoffperoxidlösung die endogenen Peroxidasen, um falsch positive Anfärbungen zu reduzieren. Die Schnitte wusch man daraufhin erneut zweimal zehn Minuten in PBS. Nun mussten 1 Stunde lang unspezifische Bindungsdomänen geblockt werden, wieder um falsch positive Anfärbungen zu reduzieren. Dazu verwendete man ein 5%iges NRS-PBS-Gemisch (NRS = *Normal Rabbit Serum*, normales Kaninchenserum). BSA, also bovines Serum, durfte aufgrund von Kreuzreaktionen gegen die Ziege nicht für die Minimierung hydrophober Reaktionen verwendet werden.

Man verwendete hierfür die kleineren 48-Well Gewebekulturplatten, da nur eine geringe Menge von 250 µl Flüssigkeit pro Well gebraucht wurde, während für Waschschritte meist die großen Platten vonnöten waren. Nun folgte die Inkubation des Primärantikörpers gegen die ChAT (aus der Ziege). Die Inkubation erfolgte über 3,5 Stunden bei Raumtemperatur in 48-Well Gewebekulturplatten mit einer Lösung aus PBS, 1% NRS, 0,2% Triton und dem Primär-Antikörper Anti-ChAT (1:200).

Nach weiteren zweimaligem Waschen in PBS folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers in einer Lösung aus PBS, 1% NRS, 0,2% Triton und dem biotinylierten Sekundärantikörper Anti-Goat (1:250) bei 4°C über Nacht (ca. 15 h).

Durch einen Orbitalschüttler wurden dabei die Schnitte in ständiger Bewegung gehalten, um eine bestmögliche Durchmischung der Komponenten zu gewährleisten.

Tag 2

Nach erneuten Waschschritten in PBS folgte nun die Inkubation mit dem ABC-Komplex, dessen Lösung aus PBS, Lösung A (1:50) und Lösung B (1:50) bestand. ABC steht für den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und musste vor der 75-minütigen Inkubation der Schnitte für 30 Minuten reagieren, damit sich der Komplex aufbauen konnte. Avidin sollte auf der einen Seite die biotinylierten Sekundärantikörper und auf der anderen Seite mit weiteren Untereinheiten die biotinylierte Peroxidase binden. Nach der Inkubation des ABC-Komplexes mussten die Schnitte wieder zweimal 10 Minuten gewaschen werden, diesmal jedoch in einer Lösung aus PBS und 0,004% Ammoniumnickelsulfat. Die Nickel-Ionen dienten der Verstärkung des Kontrasts der Färbung. Nun folgte die eigentliche Färbeprozedur. Die Färbelösung bestand aus PBS, 0,04% Ammoniumnickelsulfat, 0,004% Ammoniumchlorid, 10 mg DAB/100 ml PBS und 1 µl 35%iges Wasserstoffperoxid/100 ml PBS (DAB = Diaminobenzidin, der Farbstoff). Durch die Peroxidase des ABC-Komplexes wurde es oxidiert und es bildete sich ein braunes, wasserunlösliches Präzipitat. Dabei wurde durch den Ausfall von violett bis schwärzlich erscheinenden Nickelionen der Kontrast verstärkt. In dieser Färbelösung inkubierten die Schnitte 13 Minuten lang (siehe **Abbildung 5** links). Nach erneuter Waschung in PBS mussten letztendlich die frei flottierenden Schnitte in einem Wasserbad mit etwas Triton zur Reduktion der Oberflächenspannung auf Objektträger aufgezogen werden (siehe **Abbildung 5** rechts). Dann entwässerte man nach der Trocknung auf einer Heizfläche die Schnitte noch in einer Propanolreihe aufsteigender Konzentration (3 Minuten in 70%, 80% 90%,96%, 5 Minuten in 100% Propanol) und durch zweimaliges, 10-minütiges Bad in Xylol, damit sie schlussendlich mithilfe des Eindeckmediums Depex mit einem Deckgläschen versehen und so haltbar gemacht werden konnten.

Abbildung 5: 24-Well-Platten mit jeweils 2 Schnitten pro Well beim Färbeprozess (links), das Aufziehen der frei flottierenden Schnitte im Wasserbad auf den Objektträger (rechts)

2.7. Stereologische Auswertung der CPu-Neurone

2.7.1. Zählung der cholinergen Neurone des CPu

Aus den gegen die ChAT angefärbten, parallelen Hirnschnitten, bei denen es sich jeweils um jeden 5. Schnitt eines geschnittenen Mäusehirns handelt, wurden je nach Größe des Gehirns je 20-28 Schnitte für die Auszählung der Neurone verwendet. Für die Zählung der Neurone nutzte ich die Auswertungssoftware StereoInvestigator (v8.0, MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA). Der entsprechende Computer war mit einem digital ansteuerbaren 3-achsigen Objektträgertisch (MT12, Heidenhain, Traunreut, Deutschland), einem Mikroskop (BX 51, Olympus, Tokyo, Japan) und einer Digitalkamera (CX9000, MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA) verbunden.

Vor Beginn der eigentlichen Zählung wurde in jedem Schnitt ein Bereich („region of interest“, siehe **Abbildung 6**) festgelegt, in dem gezählt werden sollte. Dazu wurde ein 2x Objektiv verwendet und das gesamte Striatum virtuell umfahren. Folgend wurde für den markierten Bereich innerhalb des Programms ein Zählraster definiert, in welchem in horizontaler und vertikaler Richtung alle 230 µm ein 100 µm x 100 µm großes Zählfenster platziert wurde. Die Neuronenzahl wurde extrapoliert.

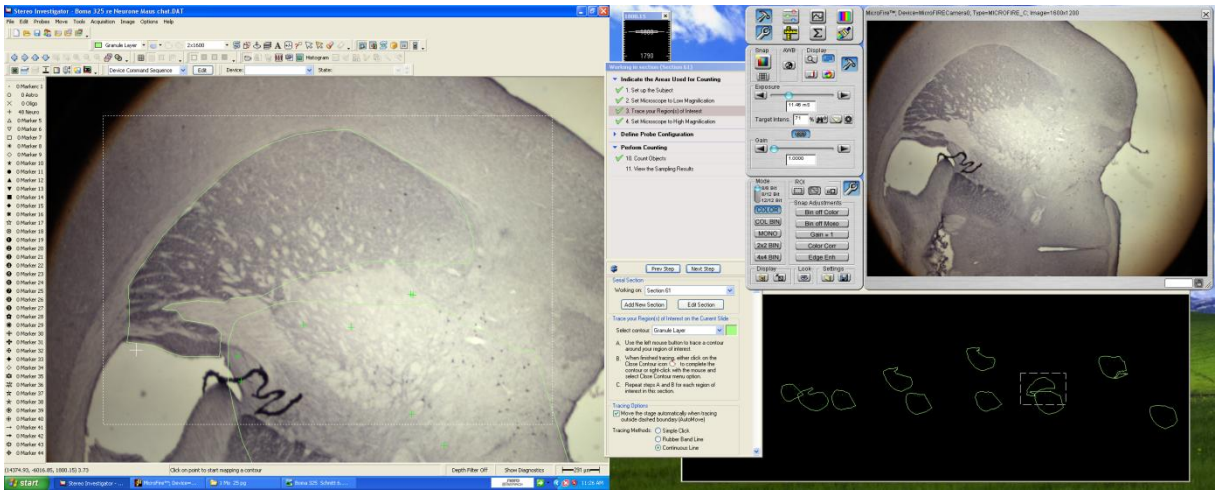

Abbildung 6: Auszählung der cholinergen Neurone mittels StereoInvestigator. Dargestellt ist eine Hemisphäre eines Mäusehirns mit grün umrandetem Striatum („Region of interest“) (Boma 325, 7.5)

Gezählt wurden unter einem 40x Objektiv (UPlanApo) alle ChAT-immunreaktiven Zellen, deren oberer Grenzpunkt innerhalb des Zählfensters oder auf der oberen oder rechten Begrenzung dessen liegt (grüner Rand). Zellen, derer oberer Grenzpunkt auf der linken oder unteren Begrenzung des Zählfensters lag (roter Rand des Zählfensters), wurden nicht mitgezählt (siehe **Abbildung 7**). Die Zellen und ihre Dendriten waren aufgrund ihrer guten Anfärbbarkeit leicht vom Hintergrund abzugrenzen und zu markieren. Es wurden sowohl die linke als auch die rechte Hemisphäre ausgewertet, um einen Vergleich zwischen BoNT-injizierter und gesunder Seite herstellen zu können. Bei insgesamt 56 Tieren machte das 112 Hemisphären.

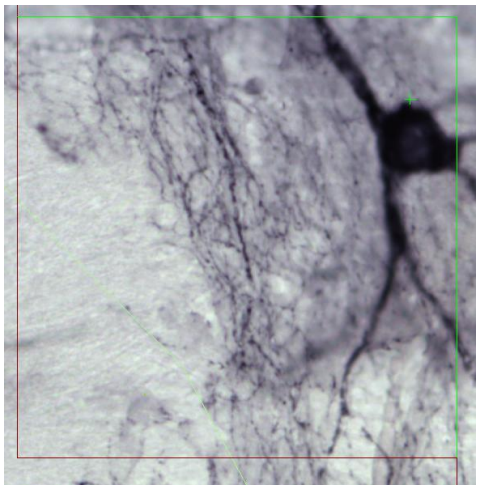

Abbildung 7: Auszählung der Neurone. Dargestellt ist eine ChAT-positive gut abgrenzbare Zelle; der obere und rechte grüne Rahmen des Zählfensters gilt als Einschlusskriterium; der kleine grüne Punkt ist die Markierung der Zelle, die vom Programm stereologisch ausgewertet wurde (Boma 330 li 8.5)

2.7.2. Statistik

Nach Einstellung der Zählparameter ergab sich für den Fehlerkoeffizienten (CE) stets ein Wert von $p \leq 0{,}05$ (Gundersen und Jensen, 1987). Der Vergleich der Neuronenanzahl zwischen linker und rechter Hemisphäre bzw. die statistische Analyse des zeitlichen Verlaufs innerhalb der Hemisphären erfolgte durch den nichtparametrischen Mann-Whitney-Test (SPSS 20). Für die zeitliche Analyse wurde jeder Zeitgruppe die Vehikel-Gruppe der jeweiligen Hemisphäre gegenübergestellt.

Für den Vergleich der Tiere mit unterschiedlichen Mengen an BoNT-Injektion nutzte man aufgrund der geringen Gruppenstärke eine nach Bonferroni korrigierte univariate Varianzanalyse. Hier wurden die Dosen bei beiden Hemisphären mit allen höheren und niedrigeren verglichen und gleiche Dosen im Vergleich links zu rechts.

Ergebnisse mit $p \leq 0{,}05$ waren hierbei als signifikant anzusehen.

Weiterhin verwendeten wir für die Untersuchung der Körpergewichte, der Gehirngewichte, der Volumina des CPu und z.T. für die Anzahl an cholinergen Interneurone die Varianzanalyse (ANOVA). Die Daten wurden mit dem Levene Median Test auf gleiche Varianz überprüft und mit dem Kolmogotov-Test (mit Lilliefors-Korrektur) auf Normalverteilung getestet, um sie dann der Verwendung parametrischer statistischer Tests zuzuführen.

Mit ein- oder zweifaktorieller ANOVA wurden normalverteilte Daten analysiert. Mehrfach-Vergleiche (Post-hoc-Tests) nach Holm-Sidak dienten dazu, signifikante Unterschiede zu isolieren.

Nicht normal-verteilte Daten wurden mittels Krustal-Wallis-Ein- oder Zwei-Wege-ANOVA an Rängen untersucht. Hier wurden die Mehrfach-Vergleiche (Post hoc) nach ANOVA an Rängen mit Hilfe des Dunn-Tests untersucht.

Für die gesamte Studie wurden P-Werte $\leq 0{,}05$ als signifikant angesehen. Alle diesbezüglichen statistischen Tests wurden mit der SigmaPlot 11 Software durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Zeitliche Veränderungen

3.1.1. Zeitliche Veränderung der mittleren Gesamtzahl der ChAT-positiven Neurone des CPu der rechten Hemisphäre

Zur Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der Veränderung der numerischen Dichte der ChAT-positiven Neurone wurden die rechten und linken Striata von insgesamt 44 Tieren vermessen, die sich auf die 5 Gruppen aufteilten. Es gab Tiere, die 1 Monat, 3 Monate, 6 Monate und 9 Monate nach BoNT-Applikation oder nach Vehikel-Injektion (ohne BoNT) untersucht wurden.

Den durch die BoNT-Injektion entstandenen Injektionskanal erkennt man an kalziumsalzhaltigen Makrophagen, welche sich entlang der Ausdehnung des Injektionskanals befanden (siehe **Abbildung 8**). Es wurde stets in die rechte Hemisphäre injiziert.

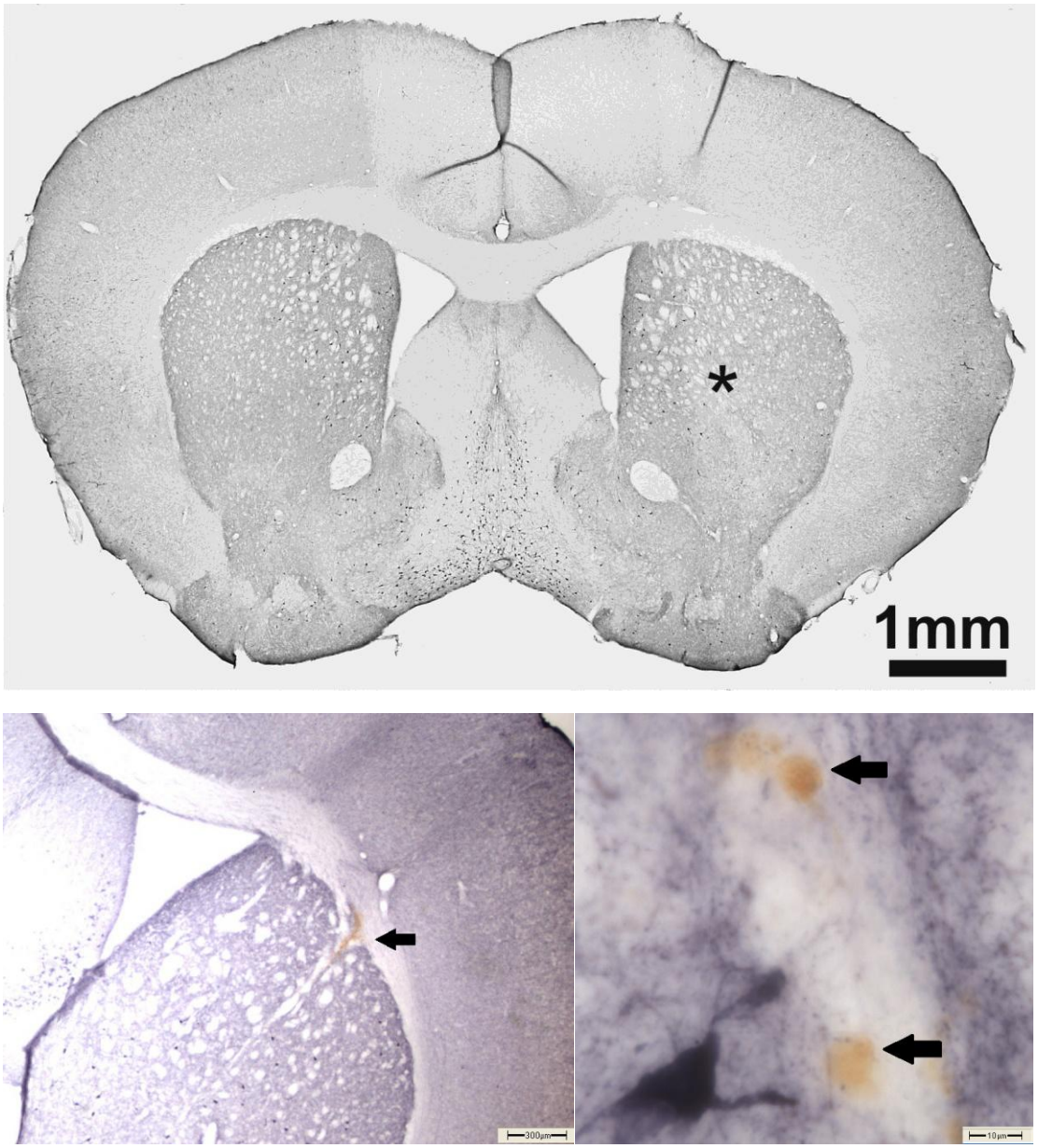

Abbildung 8: OBEN: Übersicht eines Frontalschnitts eines Mausgehirns, welches gegen ChAT gefärbt wurde, der Stern kennzeichnet die Spitze des Injektionskanals im rechten Striatum, UNTEN: Abbildung des Stichkanals (Bild links, der Pfeil deutet auf den Stichkanal, der von Makrophagen umgeben ist) und der Makrophagen (rechtes Bild, der Pfeil deutet auf Makrophagen, die Kalziumsalze eingelagert haben, dadurch braun erscheinen und den Stichkanal markieren)

Die Ansicht von gegen ChAT gefärbten immunhistochemischen Frontalschnitten eines Mausgehirns lässt keine offensichtlichen Veränderungen der Perikarya der BoNT-injizierten Seite (**Abbildung 8, Abbildung 9, A-D, F-H**) im Vergleich zur unbehandelten Seiten erkennen (**Abbildung 8, Abbildung 9, E**).

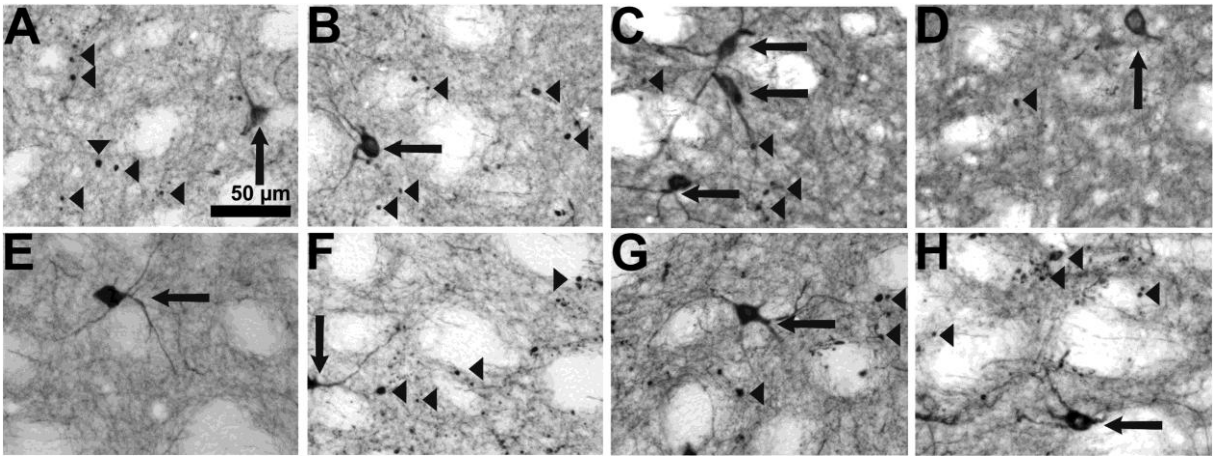

Abbildung 9: Gegen ChAT-gefärbte immunhistochemische Schnitte von Striata der Mausgehirne: cholinerge Interneurone sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet, ChAT-immunreaktive BiVs sind exemplarisch mit Pfeilspitzen gekennzeichnet, A-D: Mäuse erhielten 25 pg BoNT-A, A: Mäuse überlebten 1 Monat, B: 3 Monate, C: 6 Monate, D: 9 Monate, E: Mäuse erhielten Vehikellösung, F-H: Mäuse überlebten 6 Monate, F: nach Injektion von 50 pg BoNT-A, G: von 100 pg, H: 200 pg BoNT

1-Monats-Tiere, rechts

Die Gruppe der 1-Monats-Tiere beinhaltete 10 Tiere mit einer minimalen Anzahl an ChAT-positiven Neuronen von 2700 und einem Maximum von 19686. Es ergaben sich ein Mittelwert und eine Standardabweichung von 11645± 5935. Wenn man das Minimum als Ausreißer wertet und aus der Rechnung streicht, dann ergibt sich für den Mittelwert und die Standardabweichung 12639± 5340, was sich nicht stark von ersterem unterscheidet.

3-Monats-Tiere, rechts

Bei den 3-Monats-Tieren umfasste die Gruppe 8 Tiere mit einem Minimum an cholinergen Neuronen von 12142 und einem Maximum von 19356, was zu einem Mittelwert von 15112±2941 führte.

6-Monats-Tiere, rechts

Auch bei den 6-Monatstieren gab es 8 Versuchstiere. Bei einem Minimum von 10323 und einem Maximum von 16776 kam es zu einem Mittelwert von 13677± 1956.

9-Monats-Tiere, rechts

8 Tiere wurden 9 Monate post injectionem untersucht. Das Minimum war 7686, während das Maximum bei 16951 lag. Der Mittelwert war 13174±2725.

Vehikel-Tiere, rechts

Die Vehikel-Tiere erhielten kein BoNT-A, sondern nur die Vehikelsubstanz und stellten somit die Kontrollgruppe dar. Die minimale Anzahl der ChAT-positiven Neurone war 10744, die maximale 18406, was zu einem Mittelwert von 13540± 2690 führte.

Eine Übersicht der wichtigsten Maßzahlen zeigt **Tabelle 2**.

Alter	1Mo re	3Mo re	6Mo re	9Mo re	Vehikel re
Anzahl	19686	17516	16776	14479	10760
ChAT-positiver	7723	12565	10323	12851	12265
Interneurone	4506	16798	15473	13059	14111
im	8822	12902	13177	16951	18406
Striatum	10451	12207	12234	11595	16282
rechts	12774	17408	13367	7686	15486
	12891	19356	13963	13978	12068
	17689	12142	14102	14794	10744
	19210				11740
	2700				
Mittelwerte Neurone	11645	15112	13677	13174	13540
Standardabweichungen	5935	2941	1956	2725	2690
Anzahl Tiere	10	8	8	8	9
Min	2700	12142	10323	7686	10744
Max	19686	19356	16776	16951	18406
Mittelwert ohne Ausreißer	12639				
Standardabweichungen ohne Ausreißer	5340				

Tabelle 2: Wichtige Maßzahlen der Versuchstiere des zeitlichen Verlaufs (rechte Hemisphäre)

Signifikanz, rechts

Mithilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests haben wir alle Gruppen von Monats-Tieren gegenüber den Vehikeltieren verglichen und festgestellt, dass es zu keiner statistisch signifikanten Änderung der Anzahl ChAT-positiver Neurone kommt.

So lässt sich auf der rechten Seite eine von der Lebensdauer nach BoNT-Injektion abhängige Veränderung der Anzahl an Neuronen ausschließen. Die Injektion von BoNT führte zu keiner signifikanten Änderung der Neuronenanzahl. Eine mögliche Zytotoxizität nach intrastriataler Injektion von 25 pg BoNT-A auf das CPu der Maus ist damit über einen Zeitraum von 9 Monaten nicht nachweisbar. Die beschriebenen Ergebnisse sind in der **Abbildung 10** grafisch dargestellt.

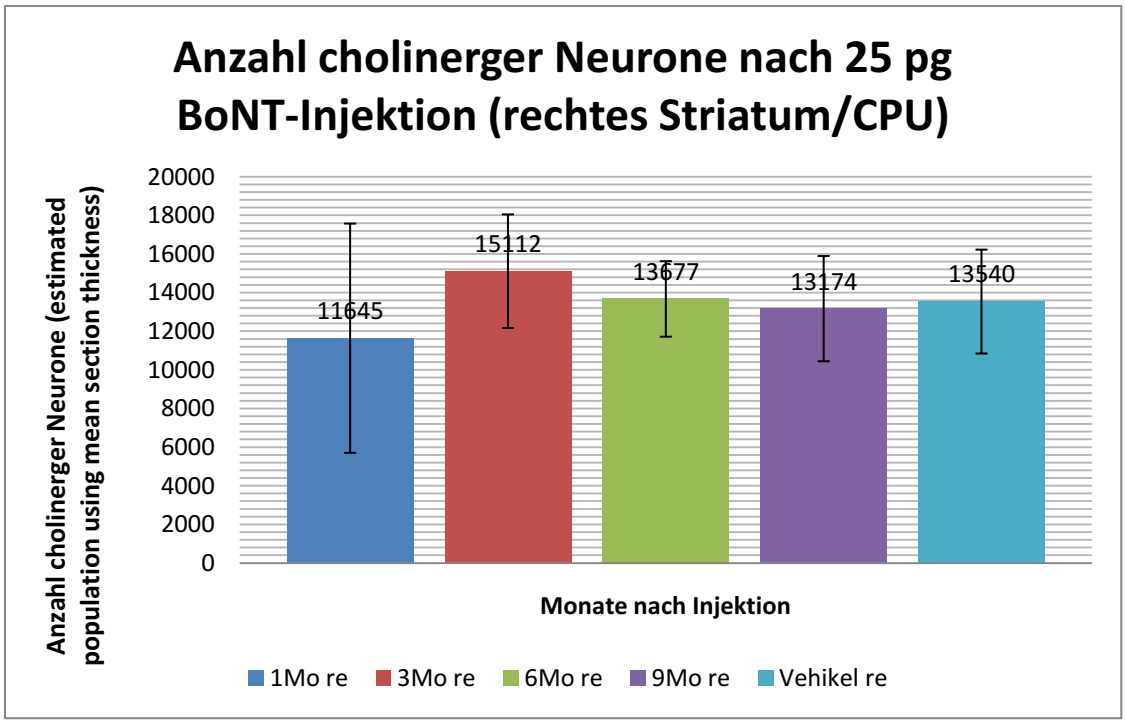

Abbildung 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der ChAT-positiven Neurone verschiedener Altersgruppen (rechte Striata). Verglichen wurden jeweils die Monatstiere mit den Vehikeltieren, wobei sich keine statistisch signifikanten Veränderungen ergaben.

3.1.2. Zeitliche Veränderung der mittleren Gesamtzahl der ChAT-positiven Neurone des CPu der linken Hemisphäre

Die linken Hemisphären der verschiedenen Altersgruppen und Vehikeltiere haben als Kontrolle keine BoNT-Injektion erhalten. Da sie die intakte Seite darstellten, wurden ihnen die BoNT-injizierten Hemisphären gegenüber gestellt. Weiterhin wurde überprüft, ob es innerhalb dieser Seite Abweichungen der Neuronenzahlen gibt.

1-Monats-Tiere, links

Die 10 Tiere dieser Gruppe hatten eine minimale Anzahl an Neuronen von 2164 und eine maximale von 18552. Der Mittelwert lag bei 11339± 4687. Auch hier war die Standardabweichung der 1 Monats-Tiere sehr hoch. Wenn man das Minimum als Ausreißer wertet und ihn aus der Rechnung nimmt, erhält man Werte von 12358+ 3609. Damit ist die Standartabweichung geringer.

3-Monats-Tiere, links

Zu den 3-Monats-Tieren gehörten 8 Tiere. 3 Monate post injectionem ergaben sich minimale Anzahlen von 12887 und maximale von 18526. Es ergaben sich somit ein Mittelwert von 15749 und eine Standardabweichung von 1935.

6-Monats-Tiere, links

Die 8 Tiere, die 6 Monate nach der Injektion der Zählung zugeführt wurden, hatten ein Minimum der Neuronenanzahl von 13311 und ein Maximum von 19907. Damit lag der Mittelwert bei 17224 ± 2395.

9-Monats-Tiere, links

Der letzten Monats-Gruppe gehörten auch 8 Tiere an. Sie hatten minimal 6959 Neurone und maximal 15898 Neurone. 12399 war der Mittelwert mit einer Standardabweichung von 2824.

Vehikel-Tiere, links

9 Tiere gehörten zu dieser Gruppe. Sie hatten minimal 8099 und maximal 17222 Zellen. Es ließ sich ein Mittelwert von 14067± 2942 berechnen.

Eine Übersicht der wichtigsten Maßzahlen zeigt **Tabelle 3.**

Alter	1Mo li	3Mo li	6Mo li	9Mo li	Vehikel li
Anzahl	11461	15493	19730	14228	16402
ChAT-positiver	9341	16951	13311	14470	12407
Interneurone	8239	12887	18636	10335	11835
im	11819	13264	14230	13528	17222
Striatum	8129	18526	19907	11498	8099
links	15824	16503	17429	6959	16761
	15313	17099	17686	15898	15638
	18552	15270	16859	12276	14736
	12544				13501
	2164				
Mittelwerte Neurone	11339	15749	17224	12399	14067
Standardabweichungen	4687	1935	2395	2824	2942
Anzahl Tiere	10	8	8	8	9
Min	2164	12887	13311	6959	8099
Max	18552	18526	19907	15898	17222
Mittelwert ohne Ausreißer	12358				
Standardabweichungen ohne Ausreißer	3609				

Tabelle 3: Wichtige Maßzahlen der Versuchstiere des zeitlichen Verlaufs (linke Hemisphäre)

Signifikanz, links

Auch hier haben wir den Monats-Tieren die Vehikeltiere gegenüber gestellt und statistisch deren Neuronenanzahl mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. Es gab nur wenige, signifikante Unterschiede. Lediglich die 6-Monats-Tiere hatten im Vergleich zu den Vehikeltieren signifikant mehr Neurone (p-Wert von 0,021). Jedoch gab es sowohl bei den jüngeren (3-Monats-Tieren) als auch bei den älteren (9-Monats-Tieren) keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr zu den Vehikel-Tieren (siehe **Abbildung 11**).

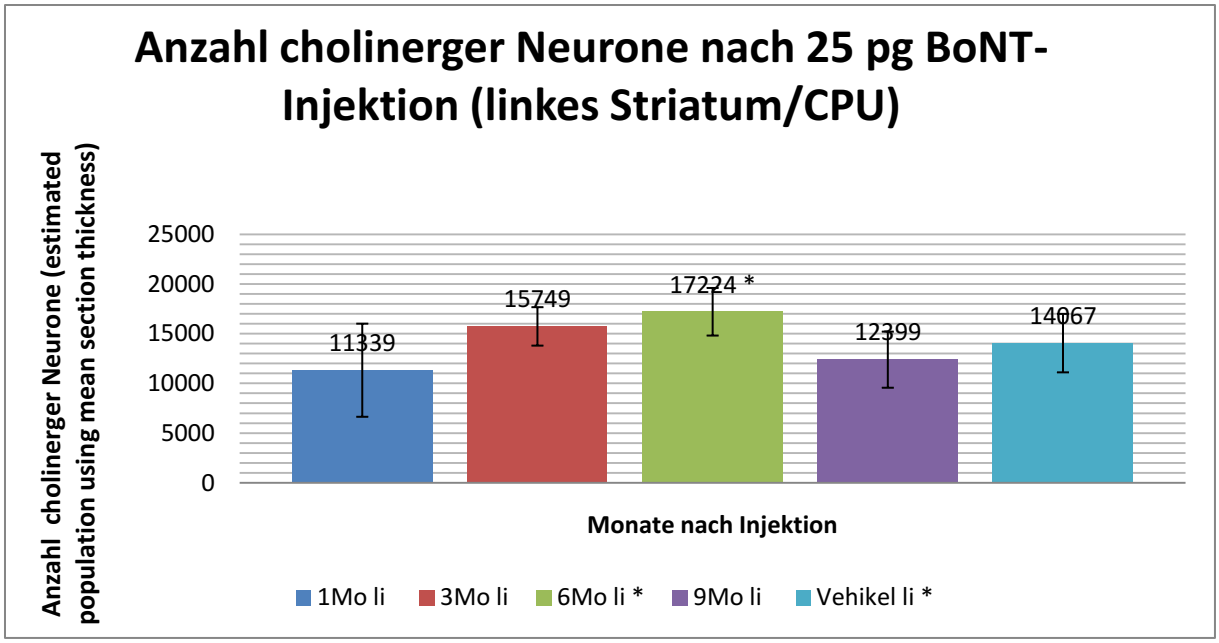

Abbildung 11: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der ChAT-positiven Neurone verschiedener Altersgruppen (linke Hemisphäre). Verglichen wurden jeweils die Monatstiere mit den Vehikeltieren, wobei sich nur bei den 6-Monats-Tieren ein signifikanter Unterschied ergab. (*)

3.1.3. Zeitliche Veränderung der mittleren Gesamtzahl der ChAT-positiven Neurone im Vergleich der behandelten und unbehandelten CPu

Ähnlich dem Vergleich der Gruppen einer einzelnen Hemisphäre ist auch die Signifikanz beim Vergleich beider Hemisphären nicht ausschlaggebend. Lediglich bei den 6-Monats-Tieren gab es auf der linken Hemisphäre mit einem p=0,009 im Mann-Whitney-Test signifikant mehr ChAT-positive Neurone als rechts. Bei den jüngeren (3-Monats-Tieren) und älteren (9-Monats-Tieren) Gruppen gab es diesen signifikanten Unterschied nicht (siehe **Abbildung 12**).

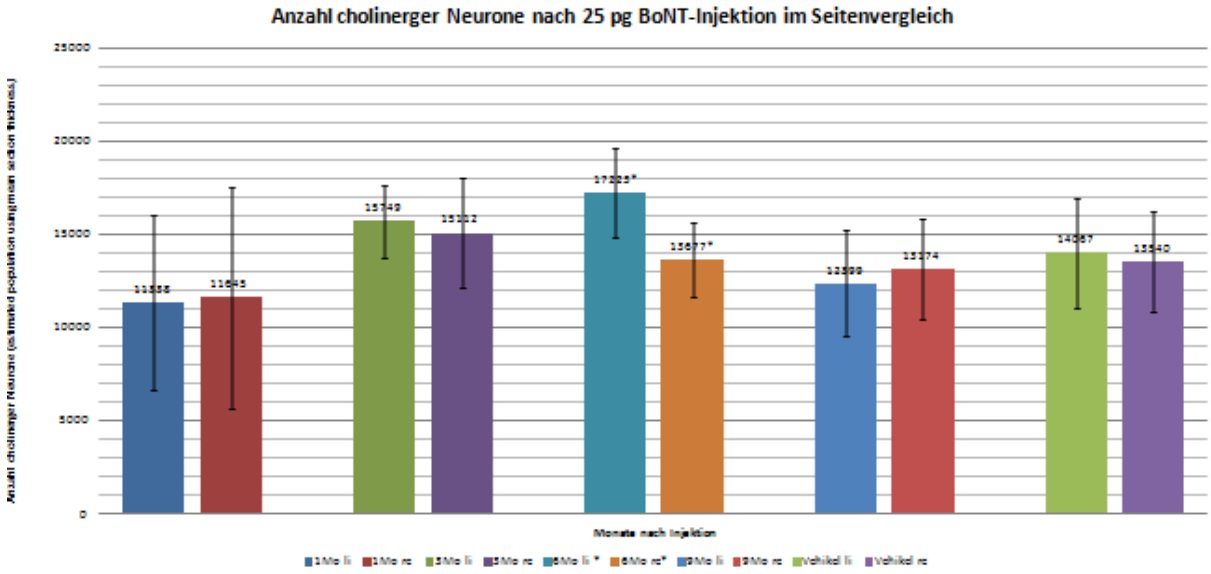

Abbildung 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der ChAT-positiven Neurone verschiedener Altersgruppen (linke und rechte Striata gegenübergestellt). Verglichen wurden jeweils die Tiere gleichen Alters untereinander, wobei sich nur bei den 6-Monats-Tieren ein signifikanter Unterschied ergab. (*)

Eine andere Untersuchungsmethode ist die Bestimmung des Standartfehlers. Unter Berücksichtigung des Standartfehlers ergaben sich für die 1 Monats-Tiere rechts 11645± 1137 (Mittelwert± Standartfehler) und links 11339±1137, für die 3 Monats-Tiere rechts 15112± 1271 und links 15749± 1271, für die 6 Monats-Tiere rechts 13677± 1271 und links 17224± 1271 und für die 9 Monats-Tiere rechts 13174± 1271 und links 12399±1271, während die Vehikel-Tiere rechts 13540± 932 und links 14067± 932 ergaben. Dargestellt sind diese Ergebnisse in **Abbildung 13.**

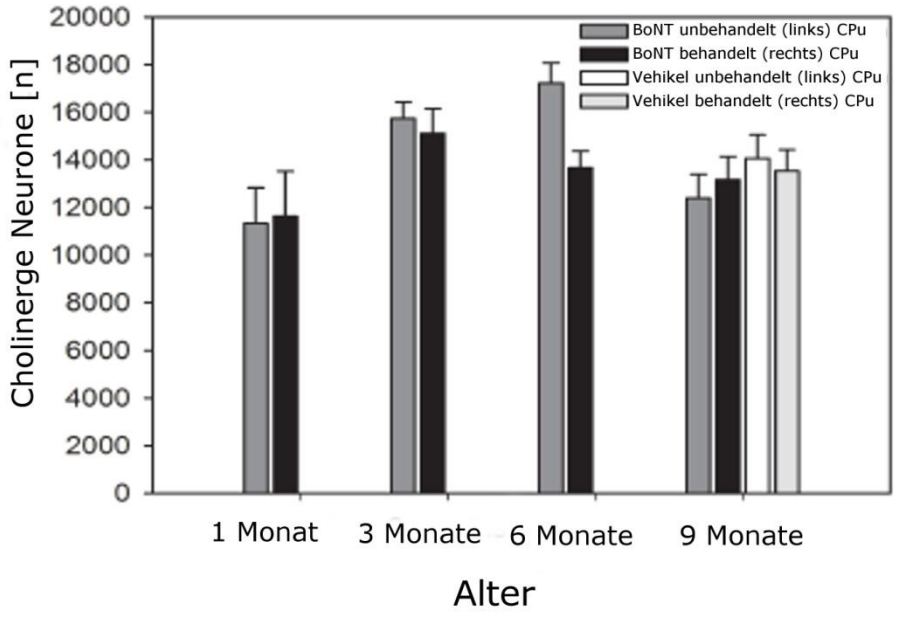

Abbildung 13: Die Anzahl ChAT-positiver Neurone nach Injektion von 25 pg BoNT-A bzw. Vehikel-Lösung ins rechte Striatum nach einem Untersuchungszeitraum von 1, 3,6 und 9 Monaten, unabhängig vom Untersuchungszeitraum blieben die Neuronenzahlen unverändert, dargestellt sind die Mittelwerte± Standartfehler

Fügt man diese Ergebnisse weiteren Tests zu (siehe 2.7.2.), so erkennt man, dass über den gesamten Untersuchungszeitraum von 9 Monaten zwischen der rechte und der linken Hemisphäre keine signifikanten Unterschiede aufgetreten sind.

3.1.4. Zeitliche Veränderung von Körpergewicht und Hirngewicht der Mäuse

Die zeitlichen Veränderungen von Körpergewicht und Hirngewicht der Mäuse zeigt **Abbildung 14**.

Das Körpergewicht wurde durch intrastriatale Applikation von 25 pg BoNT-A nicht signifikant beeinflusst. In einem Zeitraum von 1 bis 9 Monaten nach Injektion stiegt das Gewicht leicht jedoch nicht signifikant von 26,70± 0,33g (Mittelwert± Standartfehler) bei 1 Monat auf 29,25± 0,67 g bei 3 Monaten, weiter auf 32,46± 0,54 g bei 6 Monaten und 31,62± 0,80 g bei 9 Monaten. Das Körpergewicht nach 9 Monaten nach BoNT-Applikation unterschied sich nicht signifikant von der Vehikel-Gruppe nach 9 Monaten (34,27± 0,63g, **Abbildung 14, A**).

Ebenso das Gehirngewicht der Mäuse nach 1 bis 9 Monaten nach BoNT-A-Injektion blieb annähernd konstant bei 0,451± 0,008 g bei 1 Monat, 0,465± 0,008 g bei 3 Monaten, 0,478± 0,005 bei 6 Monaten und 0,439± 0,009 bei 9 Monaten. Lediglich das Gehirngewicht nach 9 Monaten nach 25 pg BoNT-Injektion war signifikant niedriger als nach 6 Monaten (**Abbildung 14, B**). Das Gehirngewicht nach 9 Monaten nach BoNT-Injektion war dem Gewicht nach Vehikel-Injektion mit 0,455± 0,007 g sehr ähnlich.

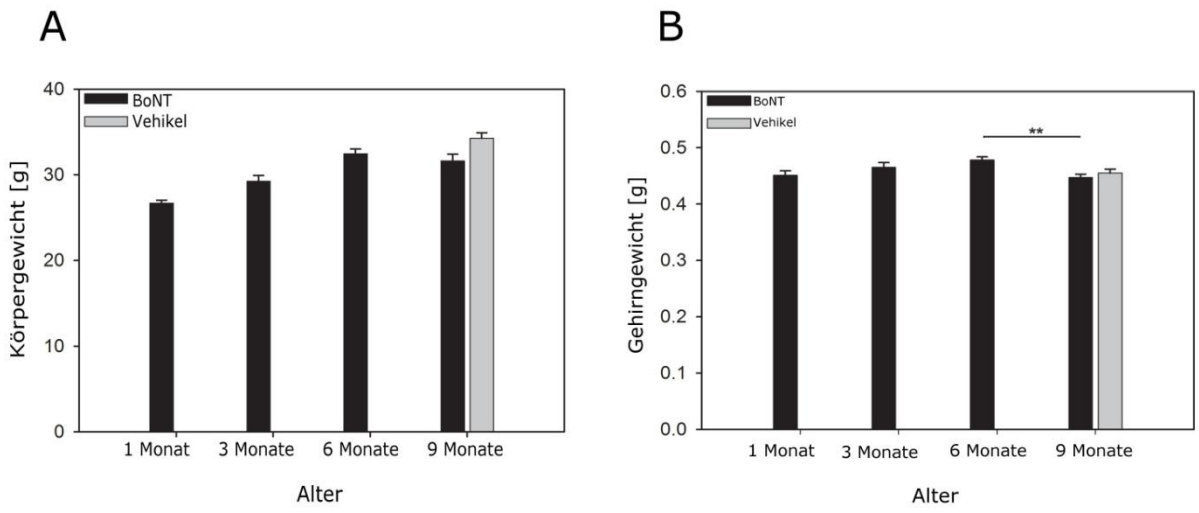

Abbildung 14: Körpergewicht (A) und Gehirngewicht (B) nach Injektion von 25 pg BoNT-A bzw. Vehikellösung ins rechte Striatum nach einem Untersuchungszeitraum von 1,3,6 und 9 Monaten**,** sowohl das Körpergewicht als auch das Gehirngewicht blieben annähernd konstant, lediglich die 9 Monats-Tiere hatten ein signifikant reduziertes Gehirngewicht im Vergleich zu den 6 Monats-Tieren, dargestellt sind Mittelwerte± Standartfehler, Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (*P<0,05, ** P<0, 01, *** P< 0, 0,01)

3.1.5. Zeitliche Veränderung vom Volumen des Striatums der Mäuse

Die zeitlichen Veränderungen vom Volumen des Striatums der Maus zeigt **Abbildung 15.**

Man erkennt, dass das Volumen des rechten CPu und des linken CPu nach Injektion von 25 pg BoNT-A bzw. Vehikel-Lösung in das rechte CPu sich in einem Zeitraum von 1- 9 Monaten post injectionem nicht signifikant zwischen den Hemisphären unterschied. Detailliert ergaben die Volumina einen Monat nach intrastriataler Injektion von 25 pg BoNT-A für das linke CPu 9,959± 0,200 mm^3 (Mittelwert± Standartfehler) und für die rechte, BoNT-injizierte Seite 9,401± 0,200 mm^3. Nach drei Monaten ergaben sich für das linke CPu 8,826± 0,224 mm^3 und für das rechte 8,429± 0,224 mm^3, nach 6 Monaten für

das linke 8,934± 0,224 und für das rechte CPu 8,499± 0,224 mm^3 und nach 9 Monaten für das linke CPu 8,422± 0,224 mm^3 und für das rechte CPu 8,095± 0,224 mm^3.

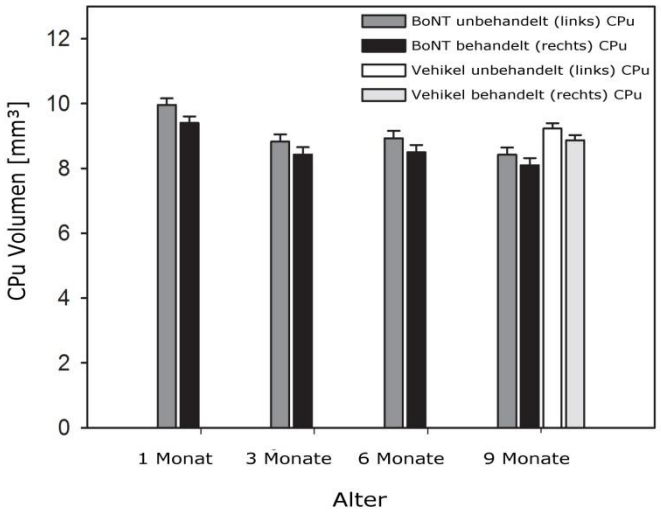

Abbildung 15: Volumen des linken und rechten CPu nach Injektion von 25 pg BoNT-A bzw. Vehikellösung ins rechte Striatum nach einem Untersuchungszeitraum von 1,3,6 und 9 Monaten, das Volumen zeigte während des gesamten Untersuchungszeitraums keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hemisphären, dargestellt sind Mittelwerte± Standartfehler, Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (*P<0,05)

3.2. Dosis-Wirkungs-Beziehung

Alle Tiere wurden 6 Monate nach BoNT-Injektion untersucht.

3.2.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung der mittleren Gesamtzahl der ChAT-positiven Neurone des CPu der rechten Hemisphäre

50 pg, rechts

Die 50pg-Gruppe bestand aus 5 Tieren mit einer durchschnittlichen Neuronenanzahl von 10617± 3513. Das Maximum an ChAT-positiven Zellen lag bei 15901, während das Minimum bei 7917 lag.

100 pg, rechts

Bei dieser Gruppe gab es auch 5 Versuchstiere. Die maximale Neuronenanzahl lag bei 20308, die minimale bei 17391, was einen Mittelwert von 18498± 1216 ergab.

200 pg, rechts

Die nur aus 2 Tieren bestehende letzte Gruppe hatte einen Mittelwert an Neuronen von 16369 und eine Standardabweichung von ± 235.

Eine Übersicht der wichtigsten Maßzahlen zeigt **Tabelle 4.**

Dosis BoNT	50 pg re	100 pg re	200 pg re
Anzahl ChAT-positiver Interneurone im Striatum rechts	12530 7940 8796 7917 15901	19049 17391 17469 18274 20308	16535 16202
Mittelwert Neurone	10617	18498	16369
Standardabweichung	3513	1216	235
Anzahl Tiere	5	5	2
min	7917	17391	16202
max	15901	20308	16535

Tabelle 4: Wichtige Maßzahlen der Versuchstiere der Dosis-Wirkungs-Beziehung (rechte Hemisphäre)

Signifikanz, rechts

Mit Hilfe einer univariaten Varianzanalyse nach Bonferroni korrigiert haben wir alle Gruppen gegeneinander verglichen. Beim Vergleich der rechten Hemisphären untereinander fiel ein signifikanter Unterschied (p=0,007) zwischen den 50 pg-Tieren und den 100 pg-Tieren auf, wobei die 100 pg-Tiere signifikant mehr Neurone hatten. Die restlichen Vergleiche ergaben keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der Neurone (siehe **Abbildung 16**).

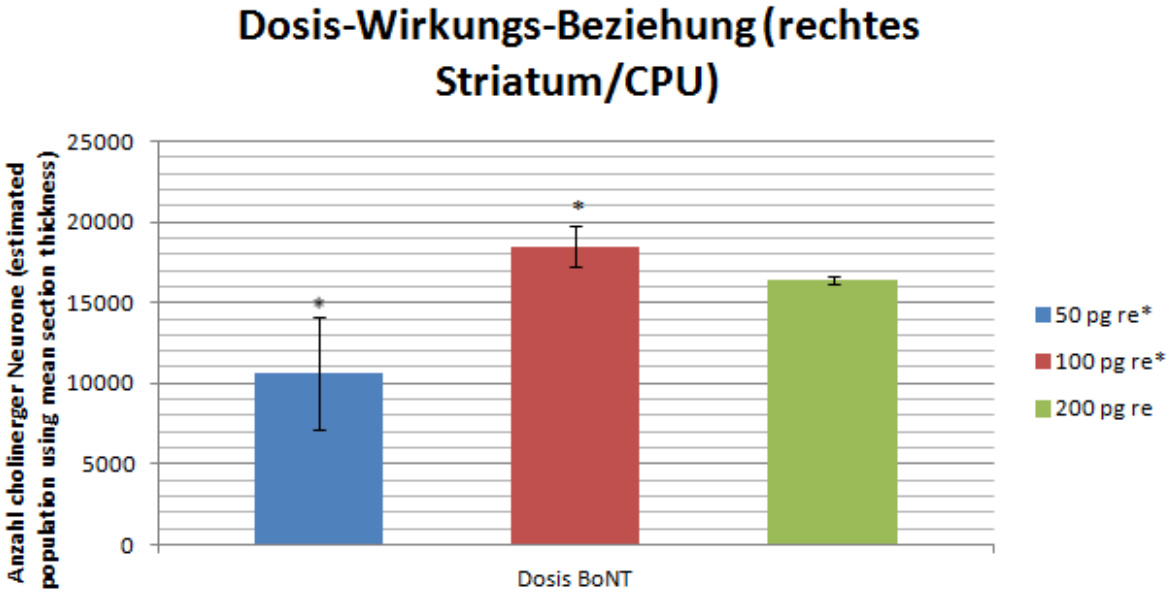

Abbildung 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der ChAT-positiven Neurone nach Injektion verschiedener Dosen von BoNT-A (rechte Striata). Verglichen wurden jeweils alle Dosen untereinander, wobei sich zwischen den 50 pg-Tieren und 100 pg-Tieren ein signifikanter Unterschied ergab. (*)

3.2.2. Dosis-Wirkungs-Beziehung der mittleren Gesamtzahl der ChAT-positiven Neurone des CPu der linken Hemisphäre

50 pg, links

Die 5 linken Hemisphären der 50 pg-Gruppe ergaben einen Mittelwert von 10474± 3290. Das Minimum lag bei 7256, das Maximum bei 14305.

100 pg, links

In dieser Gruppe ließ sich ein Mittelwert von 17309± 2015 berechnen, bei minimalen Zahlen von 14360 und maximalen von 19610.

200 pg, links

Diese Gruppe führte mit minimalen Zahlen von 13387 und maximalen von 15523 zu einem Mittelwert von 14455± 1510.

Eine Übersicht der wichtigsten Maßzahlen zeigt **Tabelle 5.**

Dosis BoNT	50 pg li	100 pg li	200pg li
Anzahl ChAT-positiver Interneurone im Striatum links	9513 7709 7256 14305 13586	19610 14360 17684 16429 18463	13387 15523
Mittelwert Neurone	10474	17309	14455
Standardabweichung	3290	2015	1510
Anzahl Tiere	5	5	2
min	7256	14360	13387
max	14305	19610	15523

Tabelle 5: Wichtige Maßzahlen der Versuchstiere der Dosis-Wirkungs-Beziehung (linke Hemisphäre)

Signifikanz, links

Auch auf der linken Seite haben wir wieder alle Gruppen untereinander verglichen und finden wie bei der rechten Hemisphäre einen signifikanten Unterschied zwischen den 50 pg-Tieren und den 100 pg-Tieren (p=0,02). Die 100 pg-Gruppe hatte signifikant mehr Neurone. Die restlichen Vergleiche zeigten keine signifikanten Unterschiede (siehe **Abbildung 17**).

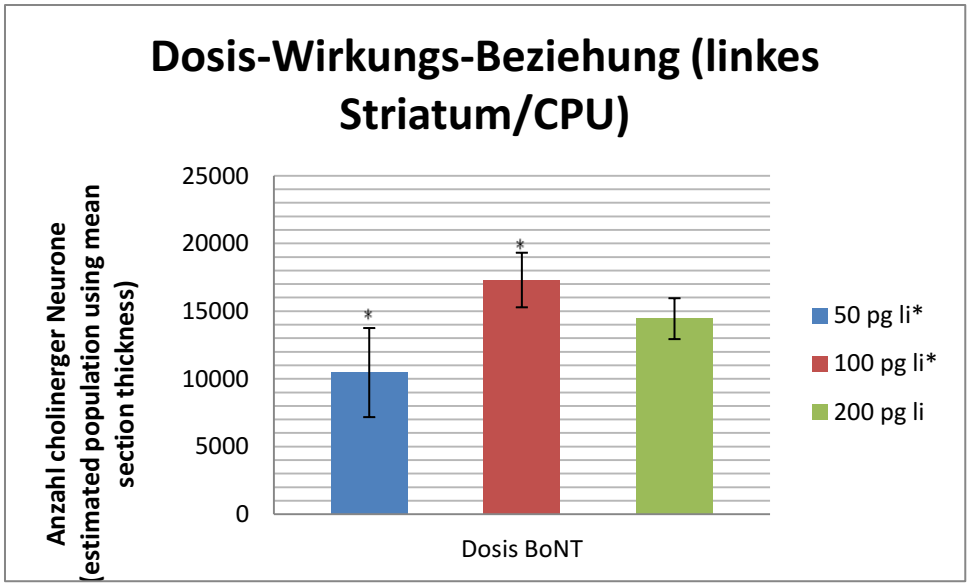

Abbildung 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der ChAT-positiven Neurone nach Injektion verschiedener Dosen von BoNT-A (linke Hemisphäre). Verglichen wurden jeweils alle Dosen untereinander, wobei sich zwischen den 50pg-Tieren und 100pg-Tieren ein signifikanter Unterschied ergab. (*)

3.2.3. Dosis-Wirkungs-Beziehung im Vergleich der behandelten und unbehandelten CPu

Beim Vergleich der rechten Hemisphäre mit der linken Hemisphäre mit gleicher Dosis an BoNT ergeben sich keine signifikanten Unterschiede (siehe **Abbildung 18**).

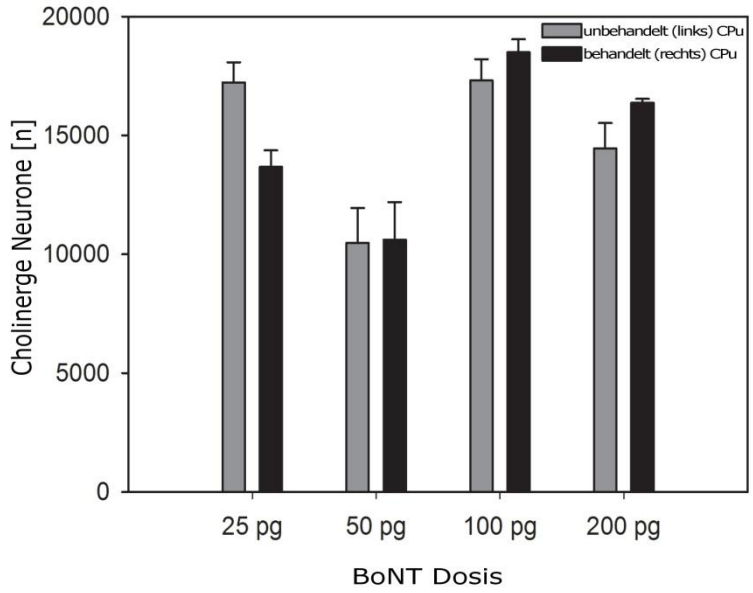

Abbildung 18: Mittelwerte und Standardfehler der Anzahl der ChAT-positiven Neurone nach Injektion verschiedener Dosen von BoNT-A (linke und rechte Striata im Vergleich). Verglichen wurden jeweils gleiche Dosen miteinander

3.2.4. Dosis-Wirkungs-Beziehung von Körpergewicht und Hirngewicht der Mäuse

Die Veränderungen von Körpergewicht und Hirngewicht der Mäuse in Abhängigkeit von applizierter BoNT-A-Dosis zeigt **Abbildung 19**.

Zu sehen ist, dass sich das Körpergewicht der Mäuse nach 6 Monaten bei höheren BoNT-Dosen unterscheidet, so haben die Mäuse nach Injektion von 25 pg BoNT-A ein Körpergewicht von 32,46± 0,54 g (Mittelwert± Standartfehler), während bei 50 pg BoNT-A ein Körpergewicht von 32,73± 1,10 g, bei 100 pg von 42,41± 2,11 g und bei 200 pg von 45,44± 0,22g vorliegt. Die Körpergewichte nach 100 und 200 pg BoNT-A waren signifikant höher als bei 25 pg oder 50 pg (**Abbildung 19,A**).

Ebenso das Gehirngewicht nach 6 Monaten nach BoNT-Injektion von 50 und 100 pg BoNT-A war signifikant verändert im Vergleich zur Injektion von 25 pg (**Abbildung 19, B**). Verglichen mit 0,478± 0,005 g bei 25 pg BoNT-A zeigten sich bei 50 pg 0,450± 0,006 g, bei 100 pg 0,446± 0,006 g und bei 200 pg 0,446± 0,011 g.

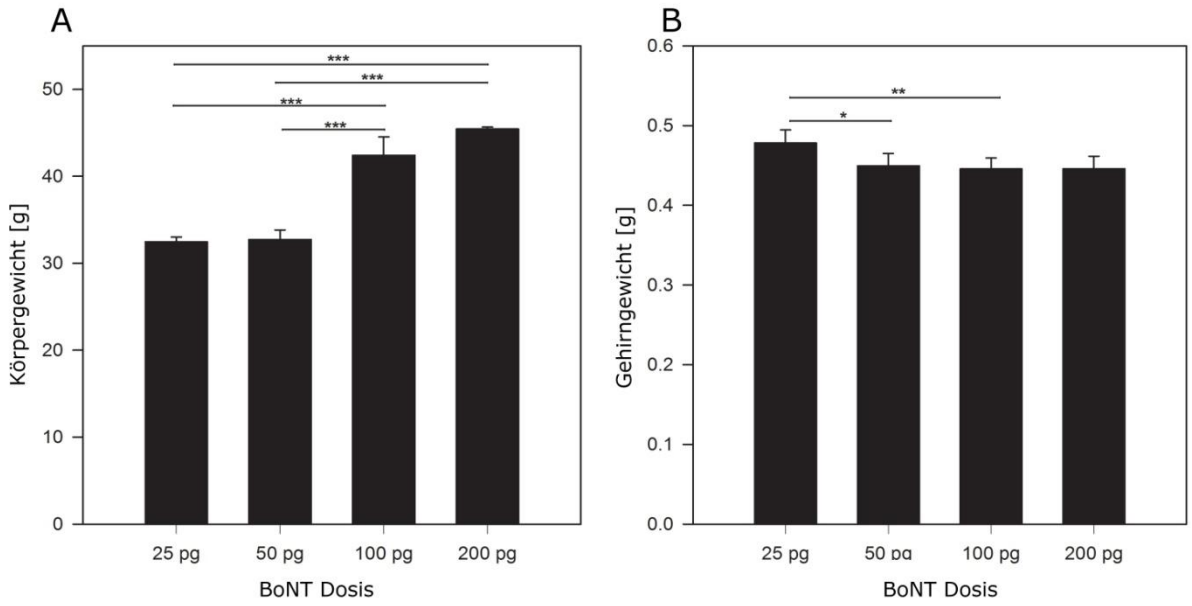

Abbildung 19: Körpergewicht und Gehirngewicht der Mäuse nach 6 Monaten nach Injektion unterschiedlicher Dosen an BoNT-A, A: das Körpergewicht der Mäuse war nach Injektion von 100 pg oder 200 pg signifikant höher als nach Injektion von 25 pg oder 50 pg, B: das Gehirngewicht der Mäuse war nach Injektion von 50 pg oder 100 pg signifikant reduziert im Vergleich zur Injektion von 25 pg; dargestellt sind Mittelwerte± Standartfehler, Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (*P<0,05, ** P<0, 01, *** P< 0, 0,01)

3.2.5. Dosis-Wirkungs-Beziehung von Volumen des Striatums der Mäuse

Die Veränderungen des Volumens des CPu der Maus in Abhängigkeit von injizierter BoNT-Dosis zeigt **Abbildung 20**.

Zu erkennen ist, dass sich das Volumen 6 Monate nach Injektion von höheren BoNT-Dosen unterscheidet, so war das Volumen nach Injektion von 50 und 200 pg BoNT-A im Vergleich zur nicht injizierten Gegenseite signifikant reduziert. 6 Monate nach intrastriataler Injektion von 25 pg BoNT-A war das Volumen des linken CPu bei 8,934± 0,224 mm^3 (Mittelwert± Standartfehler) und der rechten Seite bei 8,499± 0,224 mm^3. Nach Injektion von 50 pg BoNT-A lag das Volumen des linken CPu der Mausgehirne bei 10,751± 0,583 mm^3 und des rechten CPu bei 8,039± 0,583 mm^3, während nach Injektion von 100 pg BoNT-A das Volumen des linken CPu bei 8,662± 0,583 mm^3, des rechten CPu bei 8,023± 0,583 mm^3 und nach Injektion von 200 pg BoNT-A links bei 10,314± 0,923 mm^3 bzw. rechts bei 6,918± 0,923 mm^3 lag. Diese letzen zwei Tiere der 200 pg Tiergruppe hatten rechts ein signifikant reduziertes Volumen.

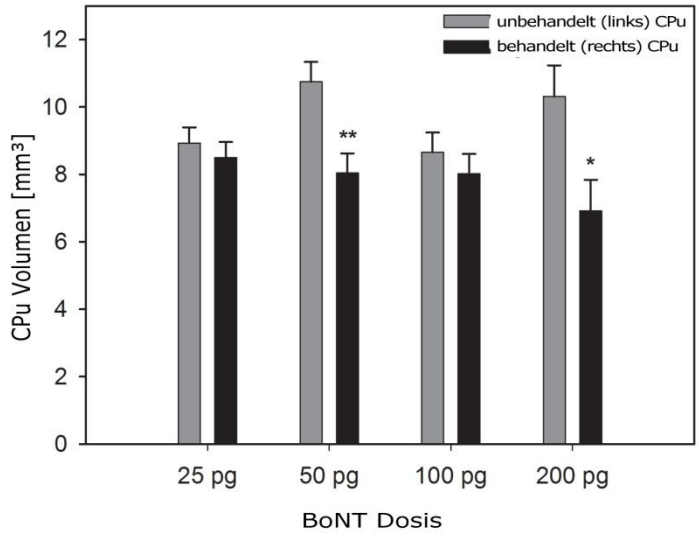

Abbildung 20: das Volumen des CPu der Mäuse nach 6 Monaten nach intrastriataler Injektion verschiedener BoNT-A-Dosen; das CPu-Volumen nach Injektion von 50 und 200 pg BoNT-A war rechts im Vergleich zu links signifikant reduziert; dargestellt sind Mittelwerte± Standartfehler, Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (*P<0,05, ** P<0, 01, *** P< 0, 0,01)

3.3. Weitere Besonderheiten

Während der Untersuchungen der cholinergen Interneurone sind kleine Anschwellungen an cholinergen Nervenzellausläufern aufgefallen, welche wir „Botulinumtoxin induzierte Varikositäten“ (BiVs, siehe **Abbildung 21, siehe auch Abbildung 9**) bezeichneten. Diese waren immunreaktiv und ließen sich in der ChAT-Färbung darstellen. Deren Auftreten und nummerische Veränderungen im Verlauf von 9 Monaten wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wree im Rahmen der Dissertation von Juliane Spiewok untersucht.

Diese Anschwellungen treten bei Mäusen nach intrastriataler Injektion von BoNT-A nur bei ChAT-positiven Neuronen auf, während sie bei Ratten sowohl bei ChAT- als auch bei TH-positiven Neuronen auftraten (siehe **Abbildung 22,** TH= Tyrosinhydroxylase).

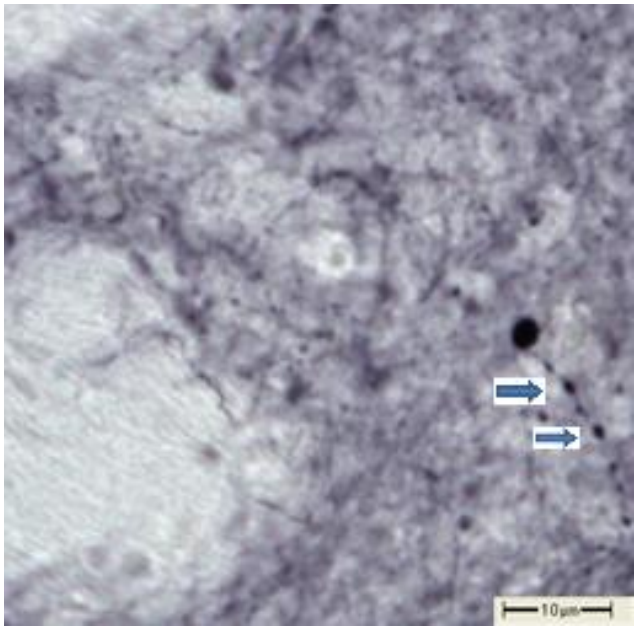

Abbildung 21: Botulinumtoxin induzierte Varikositäten
(Pfeile, Auftreibungen ChAT-postiviver Zellen)

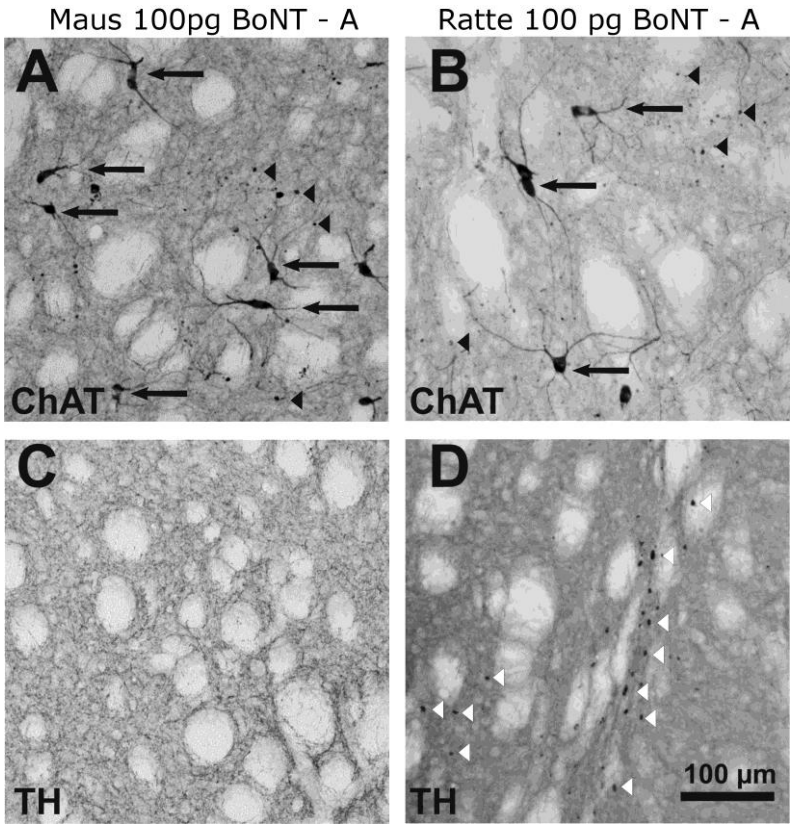

Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung gegen CHAT (A und B) und TH (C und D) der Striata von Mäusen (A und C) und Ratten (B und D) nach intrastriataler Injektion von 100 pg BoNT-A nach 6 Monaten; schwarze Pfeile kennzeichnen cholinerge Interneurone; schwarze Pfeilspitzen kennzeichnen exemplarisch cholinerge BiVs; weiße Pfeilspitzen markieren exemplarisch TH-positive BiVs bei der Ratte, welche bei der Maus nicht vorkommen

4. Auswertung und Diskussion

4.1. Auswertung der zeitlichen Analyse der Neuronenanzahlen

Da hinsichtlich der Anzahl ChAT-positiver Neurone der rechten Hemisphäre keine und bei der linken Hemisphäre nur bei den 6 Monatstieren signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen auftreten, ist davon auszugehen, dass die intrastriatale Injektion von 25 pg BoNT-A nach einem Zeitraum von bis zu neun Monaten zu keiner signifikanten Änderung der Neuronenanzahl führt und eine zytotoxische Wirkung des Toxins auf das cholinerge Transmittersystem unwahrscheinlich ist.

Die statistisch nur geringen Unterschiede beim Vergleich beider Hemisphären untereinander bestätigen diese Vermutung.

Eine Normvariante finden wir bei Boma 325. Sowohl bei den linken als auch bei den rechten Hemisphären der 1 Monatstiere gehören die Minima zu Boma 325, womit man dieses Gehirn ebenso als Ausreißer oder natürliche Normvariante werten könnte. Vermutlich aufgrund der geringen Größe des Striatums liegt die Anzahl der ausgewerteten Schnitte des Gehirnes mit der geringen Neuronenzahl mit 23 Schnitten links bzw. 21 Schnitten rechts unter der durchschnittlichen Anzahl dieser Gruppe mit 24,6 Schnitten links bzw. 24,8 Schnitten rechts. Dies könnte den Ausreißer dieses Hirns erklären (siehe auch Zählplan und -protokoll aus der Analyse des zeitlichen Verlaufs).

Das Striatum der Maus besteht zu 90 % aus Projektionsneuronen und zu 10 % aus Interneuronen, bei denen man je nach Transmitterzusammensetzung 5 verschiedene Gruppen unterteilt: I. die cholinergen Interneurone, II. Interneurone mit GABA, NO-Synthase und die Neuropeptide Somatostatin und Neuropeptid Y, III. Interneurone mit GABA und Parvalbumin, IV. Interneurone mit GABA und Calretinin und V. Interneurone mit GABA und Dopamin (Watson et al., 2012). Laut einer Studie von Rosen und Williams (2001) gibt es im Striatum der Maus etwa 1.72 ± 0.015 Mio. Neurone, von denen die cholinergen Interneurone schätzungsweise 2% ausmachen (Guo et al., 2015).

Anhand der in meiner Arbeit erhobenen Daten lässt sich feststellen, dass die Anzahl cholinerger Interneurone nach intrastriataler Injektion von 25 pg BoNT-A im Verlauf von 9 Monaten und die Daten der Arbeitsgruppe um Guo et al. (2015) sich im Prinzip in der Größenordnung ähneln, wenn auch bei der rechten läsionierten Seite als auch bei

der linken nicht-läsionierten Seite leicht unter den in der Literatur angegebenen Daten liegt. Und das obwohl sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch in der Arbeitsgruppe um Guo C57 BL/6-Mäuse verwendet werden.

Diese Abweichung könnte mit den unterschiedlichen Färbemethoden zusammenhängen. Während in der Arbeitsgruppe um Prof. Wree der Primärantikörper über 3,5 Stunden inkubierte und der Sekundärantikörper über Nacht, erfolgte bei Guo die Inkubation der Primärantikörpers über Nacht und die Inkubation der Sekundärantikörpers für eine Stunde.

Ferner haben wir einen Sekundärantikörper mit einer Konzentration von 1:250 verwendet, während in Guos Arbeit eine Konzentration von 1:500 verwendet wurde.

Der wichtigste Unterschied liegt jedoch in der Verwendung von BSA (bovines Serum). BSA kann verwendet werden, um hydrophobe Reaktionen während des Färbevorgangs zu minimieren. Jedoch kann es bei Verwendung von Antikörpern aus der Ziege zu Kreuzreaktionen kommen, sodass es in der Arbeitsgruppe von Prof. Wree keine Verwendung fand, in der Arbeitsgruppe von Guo jedoch schon. So lässt sich möglicherweise die erhöhte Neuronenanzahl bei Guo durch vermeintliche Kreuzreaktionen zwischen Ziegen-Antikörpern und Rinder-Serum erklären.

Weiterhin verwendete Guos Arbeitskreis 50 µm dicke Schnitte, während wir in unserer Arbeitsgruppe 30 µm dicke Schnitte verwendeten, was eine genauere Untersuchung ermöglicht.

Die Anzahl ChAT-positiver Neurone zeigte auch eine beträchtliche Schwankungsbreite von 11000 bis 15 000.

Unsere Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Studie an BoNT-A injizierten Ratten (Antipova et al, 2013; Mehlan et al., 2016). Hier zeigte sich, dass nach intrastriataler Injektion von 1ng BoNT-A sowohl die absolute Anzahl an striatalen Neuronen als auch die Anzahl cholinerger Interneurone annähernd konstant blieb. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die intrastriatale Injektion von BoNT-A sowohl im Mausgehirn als auch im Rattengehirn zu keiner signifikanten Zytotoxizität führt.

4.2. Auswertung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der Neuronenanzahlen

Die Auswertung der statistischen Tests der Dosis-Wirkungs-Beziehung gestaltete sich als sehr komplex.

Da die mit 100 pg Toxin behandelten rechten Hemisphären signifikant mehr cholinerge Interneurone als die mit nur 50 pg läsionierten rechten Hemisphären haben, könnte man annehmen, dass mit zunehmender Giftmenge die Bildung von Neuronen, also eine Neurogenese induziert wird.

Im Vergleich mit den 200 pg Tieren bestätigt sich diese Hypothese jedoch nicht. Weder die BoNT-injizierte Seite, noch die Kontrollseite zeigt einen signifikanten Anstieg der Neuronenanzahl bei 200 pg. Möglicherweise ist aber auch mit zunehmender Dosis an Gift die toxische Wirkung größer als die neurogenesefördernde.

Weiterhin hat auch die zur Kontrolle dienende nicht läsionierte linke Seite im Striatum bei den 100 pg Tieren signifikant mehr cholinerge Neurone als bei den 50 pg-Tieren, sodass man entweder auch von einem kontralateralen Effekt ausgehen kann oder es nicht auf den Inhalt der injizierten bzw. nicht injizierten Flüssigkeit ankommt, sondern die 100 pg Tiergruppe unabhängig von der Behandlung aufgrund ihrer biologischen Variabilität mehr cholinerge Neurone besitzt als die 50 pg-Tiergruppe.

Mit einer Gruppengröße von 5 bzw. 2 Versuchstieren pro Tiergruppe ist diese biologische Variabilität nicht auszuschließen, sodass man aus den gesammelten Daten keine Hypothese zur Wirkung des BoNT-A auf die Anzahl der cholinergen Interneurone hinsichtlich einer Dosis-Wirkungs-Beziehung ableiten kann.

Um den genauen Einfluss der Giftmenge zu beschreiben, müssten weitere Forschungen betrieben werden mit vermutlich größeren Versuchstiergruppen, um den Einfluss biologischer Variabilität möglichst gering zu halten. Sollte dies der Fall sein, müsste das auch für die Therapie berücksichtigt werden.

Dass mit zunehmender Giftmenge die Anzahl an cholinergen Neuronen nicht sinkt, ist ein positiver Hinweis auf die geringe oder nicht vorhandene Zytotoxizität von BoNT.

4.3. Auswertung der Körpergewichte und Hirngewichte

Insgesamt war das Körpergewicht in einem Untersuchungszeitraum von 9 Monaten nach BoNT-Injektion von 25 pg BoNT annähernd konstant, während das Körpergewicht nach Injektion von 100 pg oder 200 pg BoNT-A im Vergleich zur Injektion von 25 oder 50 pg nach 6 Monaten signifikant höher war. Möglicherweise ist bei höheren Dosen das injizierte BoNT in die Region des Hippocampus diffundiert, wo es das SNAP-25 gespalten haben könnte, welches essentiell ist für die Exozytose von Leptin (Mora und Pessin, 2002, Stuber und Wise, 2016). Folglich entwickelten die Mäuse aufgrund eines erniedrigten Leptin-Spiegels Adipositas.

Dieses Phänomen eines veränderten Körpergewichts zeigte sich bei Ratten, die mit 1ng BoNT-A intrastriatal behandelt wurden, nicht. Möglichweise weil das Rattengehirn ein Fünftel größer ist als ein Mäusegehirn und daher eine mögliche BoNT-A-Diffusion den Hippocampus nicht erreichte. Andererseits könnte das Mäusegehirn auch sensibler gegenüber einer BoNT-Injektion sein als ein Rattengehirn (Hanna et al, 1999; Lamanna et al, 1955; Lindström und Korkeala, 2006; ‚Sesardic und Das, 2008; Wheeler et al, 2009).

Das Gehirngewicht der Mäuse nach 1 bis 9 Monaten nach 25 pg BoNT-A-Injektion blieb annähernd konstant ähnlich den Vehikel-injizierten Tieren. Die geringe, jedoch signifikante Reduktion von 6 % des Gehirngewichts bei den 50 bis 200 pg BoNT-injizierten Tieren im Vergleich zu den 25 pg Tieren spricht für einen geringen degenerativen Prozess. Eventuell könnte dies dadurch begünstigt worden sein, dass der laterale Ventrikel auf der injizierten Seite etwas erweitert erscheint, wie man in **Abbildung 8** sieht.

4.4. Auswertung der Volumenveränderungen des Striatums

Die Volumina des rechten CPu und des linken CPu nach Injektion von 25 pg BoNT-A in das rechte Striatum blieben innerhalb eines Zeitraums von 9 Monaten nach Injektion von BoNT-A bzw. Vehikellösung annähernd konstant, sodass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hemisphären gab.

Analog zum Gehirngewicht hat sich das Volumen des CPu nach Injektion von 50 pg und 200 pg BoNT-A im Vergleich zur Gegenseite reduziert. Daher könnte man spekulieren,

dass die Reduktion des Gehirngewichts sich zum Teil in der Reduktion des Volumens des CPu begründet. Bis jetzt wurde das Gehirngewicht von Mäusen nach Injektion verschiedener BoNT-Subklassen nicht bestimmt (Antonucci et al., 2009, 2008a, 2008b; Luvisetto et al., 2003), sodass nur unsere retrospektiv gemessenen quantitativen Daten von Ratten zur Diskussion herbei gezogen werden können (Antipova et al., 2013). Das Volumen des Striatums von Ratten änderte sich nach Injektion von 1 ng BoNT-A nicht signifikant im Gegensatz zur Anfälligkeit der Mäuse gegenüber BoNT-A-Applikation (Antipova et al., 2013).

4.5. Ausblick: BoNT-A als zukünftige Therapieoption

Bereits 2011/2012 wurden Arbeiten veröffentlicht, die die intrazerebrale Injektion von Botulinumneurotoxin-A zur Therapie des experimentellen Hemiparkinson der Ratte untersucht haben (Wree et al., 2011, Hawlitschka, 2012).

Botulinumtoxine sind auch heute schon ein etablierter Bestandteil der Medizin, zum Beispiel zur Therapie der cervicalen Dystonie, als Teil der plastischen und ästhetischen Chirurgie zur Faltenstraffung oder bei hypercholinergen Erregungszuständen der Blase (siehe 1.4.2.). Auch bei diesen Therapieoptionen wird das Gift lokal injiziert, sodass Botulinumtoxine grundsätzlich zur lokalen Therapie geeignet erscheinen.

Ziel einer intrastriatalen BoNT-A-Injektion wäre es, den beim Morbus Parkinson vorherrschenden Hypercholinismus im Striatum zu antagonisieren. Durch die Interaktion des BoNT-A am SNARE-Komplex cholinerger Interneurone können diese das Acetylcholin nicht mehr vesikulär an die postsynaptische Membran freigeben, sodass dort eine anticholinerge Wirkung entsteht (siehe 1.4.1.).

Die lokale Injektion anticholinerg wirksamer Substanzen scheint deshalb so vielversprechend, da die klassische systemisch wirksame Therapie eine Vielzahl an Nebenwirkungen mit sich bringt, die die Lebensqualität der betroffenen Patienten stark einschränken. So müssen sich die Betroffenen nicht nur mit vegetativen Symptomen wie Mundtrockenheit, Übelkeit oder Erbrechen auseinandersetzen, sondern z.T. auch mit kognitiven Störungen. Bei einer der ältesten Therapiemöglichkeiten (L-Dopa) lässt auf Dauer die Wirksamkeit nach und bei den neuesten Methoden (invasive Verfahren)

können lebensbedrohliche Nebenwirkungen wie Lungenembolien auftreten, sodass noch immer nach besser verträglichen Therapieoptionen gesucht wird.

Eine lokale Injektion von BoNT-A scheint deshalb immer attraktiver.

Am Tiermodell der Ratte wurden schon erste Erfolge in der Arbeitsgruppe um Prof. Wree verzeichnet. So lässt sich im 6-OHDA-Modell (Hemiparkinson-Modell) mit Hilfe lokaler Injektion von BoNT-A parkinsonmodelltypisches apomorphininduziertes Rotationsverhalten reduzieren (Wree et al., 2011).

Ein weiterer Schritt, der uns der Therapie des Menschen näher bringen soll, ist die Verwendung des Maus-Modells, welches Grundlage dieser Dissertationsarbeit ist. Voraussetzung für Versuche am Menschen ist die fehlende Zytotoxizität des BoNT-A, welche aufgrund dieser Studie wahrscheinlich erscheint.

Sowohl in meinen Untersuchen zur Anzahl von cholinergen Neuronen im Verlauf von bis zu 9 Monaten post injectionem von 25 pg BoNT-A als auch nach unterschiedlichen Dosen an BoNT-A kommt es zu keinem signifikanten Verlust an Neuronen, was gegen eine Zytotoxizität spricht. Diese sogenannte Unbedenklichkeit ist notwendige Voraussetzung eines jeden Arzneimittels.

Mögliche weitere Voraussetzungen wären eine konstante bzw. steuerbare Dosis an BoNT-A, was durch intrastriatale Katheter realisiert werden könnte, ähnlich den Insulinpumpen beim Diabetes mellitus.

Ebenso könnte durch Weiterentwicklung der stereotaktischen Verfahren der mögliche Schaden am Hirngewebe minimiert werden.

Weitere Möglichkeiten den Kenntnisstand zur Parkinsontherapie zu erweitern, wären Untersuchungen an anderen Tiermodellen durchzuführen, zum Beispiel an Primaten.

Mit Hilfe dieser Schritte könnte die intrastriatale Injektion von BoNT-A als Therapieoption des Morbus Parkinson des Menschen immer wahrscheinlicher werden.

5. 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: J. *Neurosci* 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. (2008a): 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.

Antonucci, F.; Rossi, C.; Gianfranceschi, L.; Rossetto, O.; Caleo, M. (2008b): Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. In: *J. Neurosci*. 28, 3689–3696. doi:10.1523/JNEUROSCI.0375-08.2008

Benecke, R.; Dressler, D.; Kunesch, E.; Probst, T. (2003): Der Einsatz von Botulinumtoxin in der Therapie von Muskelschmerzen (Use of botulinum toxin the the treatment of muscle pain). In: *Schmerz* 17(6), S. 450–458.

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.; Del Tredici, K. (2010): Pathophysiology of sporadic Parkinson's disease (Pathophysiologie des sporadischen Morbus Parkinson). In: *Fortschr Neurol sychiatr* 78 Suppl 1, S. 2-4.

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.

Brigelius-Flohé, R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases, In: *Free Radic Biol Med.* 27(9-10), S. 951-65.

Brockmann, K.; Gasser, T. (2010): Genetische Hintergründe der Parkinsonerkrankung. In: *Biospektrum* 16(03.10), S. 260–265.

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, J.; Sharma, M.; Tsetsenis, T.; Buchman, V.; Etherton, M. R.; Südhof, T. 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 eurotransmitter release in vitro, and antinociceptive activity in in vivo models of pain. In: *Mov. Disord.* 19 Suppl 8, S. S42-47.

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.

Clarke, C. E. (2002): Medical management of Parkinson's disease. In: *J. Neurol. Neurosurg . Psychiatr.* 72 Suppl 1, S. I22-I27.

Constantin, 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.

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. (2005a): Botulinum toxin type A versus anticholinergics for cervical dystonia. In: *Cochrane Database Syst Rev* (1), S. CD004312.

Costa, J.; Espirito-Santo, C.; Borges, A.; Ferreira, J. J.; Coelho, M.; Moore, P.; Sampaio, C. (2005b): Botulinum toxin type A therapy for blepharospasm. In: *Cochrane Database Syst Rev*(1), S. CD004900.

Critchley, E. M. (1991): Botulism. In: *Postgrad Med J* 67 (786), S. 401.

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.

Duvoisin, R. C. (1967): Cholinergic-anticholinergic antagonism in parkinsonism. In: *Arch Neurol* 17(2), S. 124–136.

Eggert, K.; Oertel, W.; Reichmann, H. (2012): Leitlinien: Parkinson-Syndrome – Diagnostik und Therapie. AWMF online.

Eslamboli, A.; Romero-Ramos, M.; Burger, C.; Bjorklund, T.; Muzyczka, N.; Mandel, R. 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.

Gerlach, M.; Reichmann, H.; Riederer, P. (2007): Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie. 7. Aufl. Wien: Springer Verlag.

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.

Glinka, Y.; Tipton, K.F.; Youdim, M.B. (1996): Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. In: *J Neurochem*. 66(5),S. 2004-10.

Glinka, Y.; Tipton, K.F.; Youdim, M.B. (1998): Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. In: *Eur J Pharmacol.* 351(1), S. 121-9.

Goedert, M. (2015): NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Aβ, tau, and α-synuclein. In: *Science.* 349(6248), S. 1255555.

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.

Gundersen, H. J.; Jensen, E. B. (1987): The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. In: *J Microsc* 147(Pt 3), S. 229–263.

Guo, Q.; Wang, D.; He, X.; Feng, Q.; Lin, R. ; Xu, F.; Fu, L.; Luo, M. (2015): Whole-Brain Mapping of Inputs to Projection Neurons and Cholinergic Interneurons in the Dorsal Striatum. In: *PLoS One* 10(4), S. e0123381.

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.

Hanna, P.A.; Jankovic, J.; Vincent, A. (1999): Comparison of mouse bioassay and immunoprecipitation assay for botulinum toxin antibodies. In: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66, 612–616. doi:10.1136/jnnp.66.5.612

Hawkes, C. H.; Del Tredici, K.; Braak, H. (2009): Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170, S. 615–622.

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.

Hawlitschka, A. (2012): Intrastriatale Botulinum-Neurotoxin-A-Applikation im Hemiparkinson-Modell der Ratte- Funktionelle und morphologische Untersuchungen. Dissertation, Universität Rostock.

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.

Jackson, J. L.; Kuriyama,A.; Hayashino, Y. (2012): Botulinum toxin A for prophylactic treatment of migraine and tension headaches in adults: a meta-analysis. In: *JAMA* 307, S. 1736 - 1745

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.

Jungnickel, J.; Kalve, I.; Reimers, L.; Nobre, A.; Wesemann, M.; Ratzka, A.; Halfer, N.; Lindemann, C.; Schwabe, K.; Tollner, K.; Gernert, M.; Grothe, C.; (2011): Topology of intrastriatal dopaminergic grafts determines functional and emotional outcome in neurotoxin-lesioned rats. In: *Behav Brain Res* 216(1), S. 129–135.

Kawaguchi, Y.; Wilson, C. J.; Augood, S. J.; Emson, P. C. (1995): Striatal interneurones: 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.

Lamanna, C.; Jensen, W.I.; Bross, I.D. (1955): Body weight as a factor in the response of mice to botulinal toxins. In: *Am. J. Hyg*. 62, 21–8.

Lang, A. E.; Lozano, A. M. (1998): Parkinson's disease. First of two parts. In: *N Engl J Med* 339(15), S. 1044–1053.

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: *Lancet Neurol* 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.

Lindström, M.; Korkeala, H. (2006): Laboratory diagnostics of botulism. In: *Clin. Microbiol. Rev.* doi:10.1128/CMR.19.2.298-314.2006

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.

Luvisetto, 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.

Matak, I.; Lackovic, Z. (2014): Botulinum toxin A, brain and pain. In: *Prog Neurobiol* 119-120, S. 39-59

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.

Mehlan, J.; Brosig, H.; Schmitt, O.; Mix, E.; Wree, A.; Hawlitschka, A. (2016): Intrastriatal injection of botulinum neurotoxin-A is not cytotoxic in rat brain - A histological and stereological analysis. In: *Brain Res*. 1630, 18–24.

doi:10.1016/j.brainres.2015.10.056

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.

Mora, S.; Pessin, J. E. (2002): An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. In: *Diabetes. Metab. Res. Rev*. doi:10.1002/dmrr.321

Müller, T. (2012): Drug therapy in patients with Parkinson's disease. In: *Transl Neurodegener* 1 (1), S. 10.

Mutch, W. J.; Strudwick, A.; Roy, S.K.; Downie, A.W. (1986): Parkinson's disease: disability, review, and management. In: *Br Med J (Clin Res Ed)* 293(6548), S. 675-677.

Nambu, A. (2005): A new approach to understand the pathophysiology of Parkinson's disease. In: *J. Neurol.* 252 Suppl 4, S. IV1-IV4.

Naumann, M.; So, Y.; Argoff, C.E.; Childers, M.K.; Dykstra, D.D.; Gronseth, G.S.; Jabbari, B.; Kaufmann, H.C.; Schurch, B.; Silberstein, S.D.; Simpson, D.M. (2008): Assessment: Botulinum neurotoxin in the treatment of autonomic disorders and pain (an evidencebased review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. In: *Neurology* 70(19):1707–1714.

Neychev, V. K.; Gross, R. E.; Lehéricy, 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.; 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, J. A.; Rodríguez-Oroz, M. C.; Benitez-Temino, B.; Blesa, F. J.; Guridi, J.; Marin, C.; Rodriguez, M. (2008a): Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease. In: *Mov Disord.* 23 (S3), S. S548.

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.

Oertel, W. H.; Deuschl, G.; Poewe, W. (2011): Parkinson-Syndrome und andere Bewegungsstörungen, Thieme, Stuttgart

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.

Paxinos, G.; Franklin, K. B. (2004): The mouse brain in stereotaxic coordinates. In: *Gulf Professional Publishing*

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.

Robert Koch Institut (2007): Entscheidungshilfen zu medizinisch angemesssenen Vorgehensweisen in einer B-Gefahrenlage. 1. Auflage, Bonn [u.a.].

Rosen, G. D.; Williams, R. W. (2001): Complex trait analysis of the mouse striatum: independent QTLs modulate volume and neuron number. In*: BMC Neurosci* 2: S. 5.

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.

Schantz, E.J.; Johnson, E.A. (1992): Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. In: *Microbiol Rev* 56(1), S. 80–99

Schiavo, G.; Matteoli, M.; Montecucco, C. (2000): Neurotoxins affecting neuroexocytosis. In: *Physiol. Rev.* 80 (2), S. 717–766.

Sesardic, D.; Das, R. gaines (2008): Alternatives to the LD50 assay for botulinum toxin potency testing: Strategies and progress towards refinement, reduction and replacement. In: *AATEX* 14, 581–585.

Skodda, S. (2011): Aspects of speech rate and regularity in Parkinson's disease. In: *Neurol Sci* 310(1-2), S. 231-236

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.

Stuber, G. D.; Wise, R. A. (2016): Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. In: *Nat. Neurosci*. 19, 198–205. doi:10.1038/nn.4220

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: J. *Neurosci* 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, R.; Manian, P.; Gauthier, P.; Jankovic, J. (2005): Pleuropulmonary fibrosis after long-term treatment with the dopamine agonist pergolide for Parkinson Disease. In: *Arch. Neurol.* 62 (8), S. 1290–1295.

Turrens, J. 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.

Watson, C.; Paxinos, G.; Puelles, L. (2012): The Mouse Nervous System. In: *Academic Press*, S. 190

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.

Wheeler, C.; Inami, G.; Mohle-Boetani, J.; Vugia, D. (2009): Sensitivity of mouse bioassay in clinical wound botulism. In: *Clin. Infect. Dis*. 48, 1669–73. doi:10.1086/599029

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.

6. Anhang

6.1. Tabellenanhang

Name	Menge Botox, Alter	Beginn CPU-Ende CPU--> Schnittzahl li	Beginn CPU- Ende CPU--> Schnittzahl re	Bemerkungen
223	50pg, 6 Mo	5.5 (5.6 spr.)-10.3--> 25	5.5 (5.6 spr.)-10.2--> 24	7.4 re heller, 7.5 re Falte, ab 8.2 wenig Zellen?
236	50pg, 6 Mo	6.1-11.2--> 28	5.5 (5.6 spr.)-(10.3 spr.) 11.1--> 25	6.3 re Riss, Falte, generell wenig Zellen
237	50pg, 6 Mo	6.1-11.1--> 25	6.1-11.1--> 25	ersten Käppchen felht, recht wenig Zellen (8.2)
240	50pg, 6 Mo	5.5 (6.1+10.5 spr.)- 11.1--> 25	6.2-11.1--> 25	Beginn Käppchen fehlt
241	50pg, 6 Mo	6.2-10.4--> 23	6.2-10.4--> 23	Beginn Käppchen fehlt+ Ende
17	100pg	4.3-8.3--> 23	4.3-8.4--> 24	NM, 4.6 Auffälligkeiten (Verschmutzungen?), 5.4 Bleistiftverunreinigungen
18	100pg	5.3 (6.3 spr.)-9.2--> 21	5.3 (6.3 spr.)-9.4--> 23	NM, OT 7 neu Eindeckeln, 7.5 re Blasen
24	100pg	5.3- (7.1. spr.)8.5--> 23	5.3-9.4--> 27	NM
25	100pg	5.3 (5.5 spr.)-8.3--> 22	5.3 (5.5 spr.)-8.3--> 22	NM, viele Falten, Risse, Qualität ↓, 6.6 Falte, re überschlagen, li: 5.3 Anfang fehlt, 1 Riss, 5.4 Falte
26	100pg	5.5- (8.6 spr.) 9.1--> 23	5.5- 9.1--> 24	NM
30	200pg	5.3-9.2--> 22	5.3-9.2--> 22	NM
36	200pg	5.7-8.5--> 21	5.7 (5.8 spr.)-8.5--> 20	NM

Tabelle 6: Zählplan und -protokoll der Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung

Name	Menge Botox, Alter	Beginn CPU- Ende CPU --> Schnittzahl links	Beginn CPU- Ende CPU --> Schnittzahl rechts	Bemerkungen
BM 279	Vehikel, 9 Mo	5.4-10.2 --> 25	5.4-10.2-->25	
BM 280	Vehikel, 9 Mo	6.2-11.3--> 26	6.1-11.1--> 25	Systemfehler
BM 281	Vehikel, 9 Mo	5.3 (5.4 spr.)-10.3 -->25	5.3 (5.4 spr.)-10.3--> 25	spr.= springen/auslassen
BM 283	Vehikel, 9 Mo	5.6-10.4--> 25	5.6-10.4-->25	
BM 284	Vehikel, 9 Mo	5.5 (6.1 spr.)-11.2--> 26	5.5 (6.1 spr.)-11.1--> 25	7.1 Riss li , 9.4 hell li, insgesamt wenig Zellen OT8/9
BM 285	Vehikel, 9 Mo	6.2-11.3-->26	6.1-10.4 --> 24	
BM 287	Vehikel, 9 Mo	6.1- (11.2 spr.)11.3 -->25	6.1-11.1-->24	10.2/3 hell
BM 288	Vehikel, 9 Mo	6.1-11.3--> 26	5.4 (5.5 spr.)-11.1-->25	7.2 hell
BM 289	Vehikel, 9 Mo	6.2-11.2-->26	6.2-10.5--> 24	8.5 li hell, 9.5 Programm stürzt ab, 10.3 li hell
BM290	25 pg, 9 Mo	5.6-11.1--> 25	5.4-10.5--> 26	5.5 re +5.6 Riss, 6.1+6.4 Stichkanal, 7.2re+7.4 li Risse,7.2 li Verfärbungen, 9.2+9.4 kaputt
BM 291	25 pg, 9 Mo	5.3-9.3-->22	5.3-(9.2 spr.) 9.4-->22	7.2+3 re hell
BM 292	25 pg, 9 Mo	5.1-10.2--> 27	5.1-9.4--> 24	letztes Käppchen rostral fehlt re, 6.2 re+6.3 Stichkanal, 6.4 Riss re, 7.1 li hell
BM 293	25 pg, 9 Mo	5.1- 9.3-->23	5.1-9.3-->23	6.2 re Stichkanal, 7.1li +7.3re hell, 0.05/0.07 li
BM 294	25 pg, 9 Mo	5.3-10.3-->26	5.3-10.3-->26	5.3re Bivs extrastriatal, Bivs mehr li? , 6.3+7.2 re Stichkanal
BM 297	25 pg, 9 Mo	5.4-(10.1 spr.) 10.2-->23	5.4-10.2-->24	6.5 re zerteilt,6.5 li verfärbt, 7.2 re wenig Zellen?, 0,07/0.08
BM 298	25 pg, 9 Mo	5.1 (5.2 spr.)- 9.4-->24	5.1-9.1-->22	5.2 re Riss, 6.2 bds. Orange, 8.3 Grenze Kortex li
BM 299	25 pg, 9 Mo	5.4 (5.5 spr.)- (8.3 spr.) 10.3--->23	5.3- (9.3 spr.) 9.4-->21	6.5 re + 7.3re Risse, 8.3 li kaputt, 9.2 li hell
BM 311	25 pg, 9 Mo	5.2-9.1-->22	7.6 normal-(9.3 spr.) 9.4-->9 (Beginn fehlt)	Atrophie Striatum--> nicht ausgezählt!, re Cortex fehlt, 6.1 re orange
BM 318	25 pg, 1 Mo	5.6 (6.1 spr.) -9.2--> 24	5.6-9.2 -->25	durcheinander, 7.6 wenig Zellen, 0.06/0.07
BM 319	25 pg, 1 Mo	5.5 (5.6 spr.)- 9.6--> 27	5.7 (6.1, 10.1 spr.)-10.2 -->26	0.07= m1 re, OT7 wenig Zellen, 8.3 li hell, 0.06=m1 li
BM 320	25 pg, 1 Mo	6.2-11.2-->25	6.3-11.4 --> 26	0.09= m1 re, 0.06 li
BM 321	25 pg, 1 Mo	5.7 (5.8, 9.2 spr.)- 9.3-->24	5.7 (5.8, 9.4 spr.)-9.5-->26	6.3 li Falte, 6.5 Falte, 7.6 kaputt, recht kleines Gehirn li
BM 322	25 pg, 1 Mo	5.10- (9.1 spr.) -9.2 -->26	5.8 (5.9, 8.5 spr.)-8.6-->25	7.2 li hell
BM 323	25 pg, 1 Mo	6.2-10.1--> 24	6.3- (10.2 spr.)10.3-->25	6.2 verfärbt/Falte, 9.1 li Falte, 9.2 li Riss
BM 324	25 pg, 1 Mo	6.2-10.1--> 26	6.2 (6.3, 9.5 spr.)-10.2-->25	6.3 li +6.4 li Riss
BM 325	25 pg, 1 Mo	6.1-9.2 -->23	6.1 (8.5 spr.)-9.1-->21	0.12/0.11 m1/m0 fast keine Neurone, siehe Screenshot!, 6.7 li+ 7,1 li Riss, 0.13/0.13 li
BM 326	25 pg, 1 Mo	5.7 (5.8, 8.6 spr.)- 8.7 --> 23	5.7 (5.8, 8.6 spr.)- 8.7 --> 23	
BM 327	25 pg, 1 Mo	5.13-8.6-->24	5.11-8.6--> 26	Bläschen re, 5.12 li kaputt--> Anfang fehlt li , 6.4 kaputt, 6.5 Systemabsturz, 7.1/2+ 7.4 li Risse
BM 328	25 pg, 3 Mo	5.5-10.3 -->23	5.4-10.3-->25	durcheinander, 5.5 Gefäße, re hell, 6.1 Gefäße, 10.2/3. hell
BM 329	25 pg, 3 Mo	5.4-10.1-->23	5.4-10.2-->24	5.6 unregelmäßig gefärbt
BM 330	25 pg, 3 Mo	5.5-10.5-->26	5.4 (10.2 spr.)-10.3-->24	10.2 Gefäße, siehe Screenshot
BM 331	25 pg, 3 Mo	5.5 (6.1 spr.)-10.4 -->23	5.5 (6.1 spr.)-10.4 -->23	9.2 Blasen, wenig Zellen, Gefäße
BM 333	25 pg, 3 Mo	6.1- (10.4 spr.)-10.5 -->24	6.1-10.5 -->25	
BM 334	25 pg, 3 Mo	5.5-11.1-->25	5.6-11.1-->24	6.2 unregelmäßig gefärbt
BM 335	25 pg, 3 Mo	5.5 (5.6 spr.)-10.1-->23	6.1 (10.2 spr.)- 10.3--> 23	re 8.2 hell
BM 336	25 pg, 3 Mo	5.5 (6.1 spr.)-10.4 -->24	5.5 (6.1 spr.)-10.3-->23	
BM 337	25 pg, 6 Mo	6.1-11.1-->26	5.5-10.4-->25	
BM 338	25 pg, 6 Mo	5.5-11.2-->27	5.5-11.2-->27	
BM 340	25 pg, 6 Mo	5.5-11.3-->28	5.5-11.1-->26	
BM 341	25 pg, 6 Mo	5.4- 12.2-->25	5.4-12.1-->24	7.1,9.4,11.1 springen re+li
BM 342	25 pg, 6 Mo	6.1.2-11.4--> 26	6.3-10.4--> 20 Pilotzählung	
BM 343	25 pg, 6 Mo	5.5-11.3--> 27	5.3 (5.4, 11.1 spr.)-11.2-->26	
BM 344	25 pg, 6 Mo	5.5-10.5-->26	5.5-11.1-->27	6.1+ 6.5 re Stichkanal, 7.2 hell li
BM 346	25 pg, 6 Mo	5.5-10.4-->26	5.5-10.4-->26	
			• re (Botox-Seite)	
			grün= schon gezählt	
			∑ 44 Hirne/ 88 Hemisphären	
			Stand: 17.12.13	

Tabelle 7: Zählplan und -protokoll der Analyse des zeitlichen Verlaufs

Data File	Marker		Total Markers Counted	Number of Sections	Region	Number of Sampling Sites	User Defined Mounted Thickness	Measured Defined Mounted Thickness	Estimated Population using User Defined Section Thickness	Estimated Population using Mean Section Thickness	Estimated Population using Mean Section Thickness with Counts	Estimated Population using Number Weighted Section Thickness	Coefficient of Error (Gundersen), m=0	Coefficient of Error (Gundersen), m=1	1st Estimated CE (Schmitz-Hof)	2nd Estimated CE (Schmitz-Hof)	Counting Frame Area (XY) (µm²)	Sampling Grid Area (XY) (µm²)
Boma 223 re	Neuro	50 pg re	277	24	Granule Laye	1110	0,0	17,1	n/a	12530,40	12667,67	12797,12	0,06	0,06	0,067	0,060	10000,0	52900,0
Boma 236 re	Neuro	50 pg re	163	25	Granule Laye	1300	0,0	18,4	n/a	7940,01	7708,56	7703,59	0,09	0,08	0,086	0,078	10000,0	52900,0
Boma 237 re	Neuro	50 pg re	197	25	Granule Laye	1255	0,0	16,9	n/a	8796,15	8711,22	8850,25	0,08	0,07	0,074	0,071	10000,0	52900,0
Boma 240 re	All Markers	50 pg re	166	25	Granule Laye	1263	0,0	18,0	n/a	7916,51	7976,01	7766,50	0,08	0,08	0,084	0,078	10000,0	52900,0
Boma 241 re	Neuro	50 pg re	305	23	Granule Laye	1169	0,0	19,7	n/a	15901,19	15935,28	16095,02	0,06	0,06	0,059	0,057	10000,0	52900,0
Boma 17 re N	Neuro	100 pg re	409	24	Granule Laye	1217	0,0	17,6	n/a	19048,56	19093,10	19012,44	0,06	0,05	0,052	0,049	10000,0	52900,0
Boma 18 re N	Neuro	100 pg re	429	23	Granule Laye	1177	0,0	15,3	n/a	17391,17	17400,92	17338,24	0,06	0,05	0,051	0,048	10000,0	52900,0
Boma 24 re N	Neuro	100 pg re	402	27	Granule Laye	1215	0,0	16,4	n/a	17469,44	17541,13	17574,87	0,06	0,05	0,052	0,050	10000,0	52900,0
Boma 25 re N	Neuro	100 pg re	411	22	Granule Laye	1206	0,0	16,8	n/a	18273,73	18325,03	18272,12	0,05	0,05	0,049	0,049	10000,0	52900,0
Boma 26 re N	Neuro	100 pg re	462	24	Granule Laye	1174	0,0	16,6	n/a	20307,91	20412,54	20505,32	0,06	0,05	0,049	0,047	10000,0	52900,0
Boma 30 re N	Neuro	200 pg re	417	22	Granule Laye	1050	0,0	15,0	n/a	16534,75	16546,49	16664,84	0,06	0,05	0,053	0,049	10000,0	52900,0
Boma 36 re N	Neuro	200 pg re	410	20	Granule Laye	1013	0	14,9	n/a	16202,05	16235,25	16381,93	0,05	0,05	0,055	0,049	10000	52900
Boma 223 li N	Neuro	50 pg li	240	25	Granule Laye	1264	0	15	n/a	9513,03	9488,61	9544,29	0,06	0,06	0,067	0,065	10000	52900
Boma 236 li N	Neuro	50 pg li	180	28	Granule Laye	1409	0	16,2	n/a	7708,54	7668,6	7641,29	0,08	0,07	0,079	0,075	10000	52900
Boma 237 li N	Neuro	50 pg li	163	25	Granule Laye	1343	0	16,8	n/a	7256,27	7361,69	7277,43	0,08	0,08	0,086	0,078	10000	52900
Boma 240 li N	Neuro	50 pg li	289	25	Granule Laye	1301	0	18,7	n/a	14304,79	14369,53	14536,83	0,06	0,06	0,062	0,059	10000	52900
Boma 241 li N	Neuro	50 pg li	301	23	Granule Laye	1227	0	17,1	n/a	13586,43	13621,61	13636,81	0,07	0,06	0,062	0,058	10000	52900
Boma 17 li N	Neuro	100 pg li	413	23	Granule Laye	1229	0	18	n/a	19609,88	19661,35	19616,52	0,06	0,05	0,05	0,049	10000	52900
Boma 18 li N	Neuro	100 pg li	379	21	Granule Laye	1251	0	14,3	n/a	14360,47	14328,7	14209,64	0,06	0,05	0,052	0,051	10000	52900
Boma 24 li N	Neuro	100 pg li	382	23	Granule Laye	1302	0	17,5	n/a	17683,95	17760,42	17929,5	0,06	0,05	0,057	0,051	10000	52900
Boma 25 li N	Neuro	100 pg li	359	22	Granule Laye	1311	0	17,3	n/a	16429,11	16478,7	16561,46	0,06	0,05	0,055	0,053	10000	52900
Boma 26 li N	Neuro	100 pg li	400	23	Granule Laye	1304	0	17,5	n/a	18463,12	18469,03	18535,39	0,06	0,05	0,051	0,05	10000	52900
Boma 30 li N	Neuro	200 pg li	301	22	Granule Laye	1120	0	16,8	n/a	13387,21	13369,71	13206,04	0,07	0,06	0,06	0,058	10000	52900
Boma 36 li N	Neuro	200 pg li	409	21	Granule Laye	1175	0,0	14,3	n/a	15523,47	15523,47	15594,72	0,05	0,05	0,052	0,049	10000,0	52900,0

Tabelle 8: „results“, Zählresultate der Dosis-Wirkungsbeziehung

Data File		Marker	Total Markers Counted	Number of Sections	Region	Number of Sampling Sites	User Defined Mounted Thickness	Measured Defined Mounted Thickness	Estimated Population using User Defined Section Thickness	Estimated Population using Mean Section Thickness	Estimated Population using Mean Section Thickness with Counts	Estimated Population using Number Weighted Section Thickness	Coefficient of Error (Gundersen), m=0	Coefficient of Error (Gundersen), m=1	1st Estimated CE (Schmitz-Hof)	2nd Estimated CE (Schmitz-Hof)	Counting Frame Area (XY) (µm²)	Sampling Grid Area (XY) (µm²)
Boma 318 li Neurone Maus chat.DAT	1Mo li	Neuro	301	24	Granule Laye	1480	0,0	14,4	n/a	11460,51	11465,71	11502,39	0,07	0,06	0,060	0,058	10000,0	52900,0
Boma 319 li Neurone Maus chat.DAT	1Mo li	Neuro	265	27	Granule Laye	1622	0,0	13,3	n/a	9340,83	9345,66	9395,02	0,08	0,06	0,066	0,061	10000,0	52900,0
Boma 320 li Neurone Maus chat.DAT	1Mo li	Neuro	255	25	Granule Laye	1398	0,0	12,2	n/a	8238,66	8292,49	8312,28	0,06	0,06	0,065	0,063	10000,0	52900,0
Boma 321 li Neurone Maus chat.DAT	1Mo li	Neuro	301	24	Granule Laye	1360	0,0	14,8	n/a	11819,01	11818,76	11884,08	0,05	0,06	0,059	0,058	10000,0	52900,0
Boma 322 li Neurone Maus chat.DAT	1Mo li	Neuro	240	26	Granule Laye	1520	0,0	12,8	n/a	8129,21	8137,96	8180,25	0,07	0,06	0,066	0,065	10000,0	52900,0
Boma 323 li Neurone Maus chat.DAT	1Mo li	Neuro	420	24	Granule Laye	1460	0,0	14,2	n/a	15824,49	15848,76	15921,11	0,05	0,05	0,049	0,049	10000,0	52900,0
Boma 324 li Neurone Maus chat.DAT	1Mo li	Neuro	446	26	Granule Laye	1538	0,0	13,0	n/a	15312,73	15305,02	15404,78	0,06	0,05	0,050	0,047	10000,0	52900,0
Boma 325 li Neurone Maus chat.DAT	1Mo li	Neuro	64	23	Granule Laye	1406	0,0	12,8	n/a	2164,12	2188,38	2183,51	0,13	0,13	0,132	0,125	10000,0	52900,0
Boma 326 li Neurone Maus chat.DAT	1Mo li	Neuro	491	23	Granule Laye	1282	0,0	14,3	n/a	18551,52	18530,42	18700,08	0,05	0,05	0,047	0,045	10000,0	52900,0
Boma 327 li Neurone Maus chat.DAT	1Mo li	Neuro	360	24	Granule Laye	1522	0,0	13,2	n/a	12543,53	12559,40	12674,30	0,05	0,05	0,055	0,053	10000,0	52900,0
Boma 328 li Neurone Maus chat.DAT	3Mo li	Neuro	405	23	Granule Laye	1406	0,0	14,5	n/a	15492,98	15583,63	15669,86	0,06	0,05	0,051	0,050	10000,0	52900,0
Boma 329 li Neurone Maus chat.DAT	3Mo li	Neuro	440	23	Granule Laye	1316	0,0	14,6	n/a	16950,54	16983,07	17067,76	0,05	0,05	0,048	0,048	10000,0	52900,0
Boma 330 li Neurone Maus chat.DAT	3Mo li	Neuro	365	26	Granule Laye	1376	0,0	13,3	n/a	12886,89	13007,79	13114,28	0,06	0,05	0,053	0,052	10000,0	52900,0
Boma 331 li Neurone Maus chat.DAT	3Mo li	Neuro	368	23	Granule Laye	1311	0,0	13,6	n/a	13264,44	13306,12	13401,00	0,06	0,05	0,052	0,052	10000,0	52900,0
Boma 333 li Neurone Maus chat.DAT	3Mo li	Neuro	462	24	Granule Laye	1229	0,0	15,2	n/a	18525,73	18577,46	18620,74	0,05	0,05	0,050	0,047	10000,0	52900,0
Boma 334 li Neurone Maus chat.DAT	3Mo li	Neuro	453	25	Granule Laye	1225	0,0	13,8	n/a	16502,52	16520,30	16633,17	0,05	0,05	0,050	0,047	10000,0	52900,0
Boma 335 li Neurone Maus chat.DAT	3Mo li	Neuro	483	23	Granule Laye	1296	0,0	13,4	n/a	17099,32	17191,82	17541,02	0,06	0,05	0,047	0,046	10000,0	52900,0
Boma 336 li Neurone Maus chat.DAT	3Mo li	Neuro	424	24	Granule Laye	1258	0,0	13,6	n/a	15269,84	15263,79	15331,65	0,05	0,05	0,050	0,049	10000,0	52900,0
Boma 337 li Neurone Maus chat.DAT	6Mo li	Neuro	478	26	Granule Laye	1284	0,0	15,6	n/a	19729,63	19727,95	20001,21	0,05	0,05	0,046	0,046	10000,0	52900,0
Boma 338 li Neurone Maus chat.DAT	6Mo li	Neuro	355	27	Granule Laye	1391	0,0	14,2	n/a	13310,61	13337,45	13430,24	0,06	0,05	0,056	0,053	10000,0	52900,0
Boma 340 li Neurone Maus chat.DAT	6Mo li	Neuro	480	28	Granule Laye	1387	0,0	14,7	n/a	18636,35	18706,46	18969,36	0,05	0,05	0,047	0,046	10000,0	52900,0
Boma 341 li Neurone Maus chat.DAT	6Mo li	Neuro	391	25	Granule Laye	1211	0,0	13,8	n/a	14230,00	14237,63	14262,93	0,05	0,05	0,051	0,051	10000,0	52900,0
Boma 342 li Neurone Maus chat.DAT	6Mo li	Neuro	432	26	Granule Laye	1293	0,0	17,4	n/a	19906,69	19965,52	20238,44	0,05	0,05	0,051	0,048	10000,0	52900,0
Boma 343 li Neurone Maus chat.DAT	6Mo li	Neuro	471	27	Granule Laye	1367	0,0	14,0	n/a	17429,49	17441,12	17585,88	0,05	0,05	0,047	0,046	10000,0	52900,0
Boma 344 li Neurone Maus chat.DAT	6Mo li	Neuro	488	26	Granule Laye	1438	0,0	13,7	n/a	17685,62	17689,62	17852,36	0,05	0,05	0,046	0,045	10000,0	52900,0
Boma 346 li Neurone Maus chat.DAT	6Mo li	Neuro	450	26	Granule Laye	1258	0,0	14,2	n/a	16858,99	16895,34	16992,63	0,05	0,05	0,048	0,047	10000,0	52900,0
Boma 290 li Neurone Maus chat.DAT	9Mo li	Neuro	350	25	Granule Laye	1361	0,0	15,4	n/a	14228,43	14223,60	14337,87	0,06	0,05	0,056	0,053	10000,0	52900,0
Boma 291 li Neurone Maus chat.DAT	9Mo li	Neuro	352	22	Granule Laye	1118	0,0	15,5	n/a	14469,55	14513,17	14699,92	0,06	0,05	0,056	0,053	10000,0	52900,0
Boma 292 li Neurone Maus chat.DAT	9Mo li	Neuro	274	27	Granule Laye	1298	0,0	14,3	n/a	10334,61	10344,04	10416,06	0,06	0,06	0,065	0,060	10000,0	52900,0
Boma 293 li Neurone Maus chat.DAT	9Mo li	Neuro	369	23	Granule Laye	1264	0,0	13,9	n/a	13527,72	13557,96	13588,72	0,07	0,05	0,055	0,052	10000,0	52900,0
Boma 294 li Neurone Maus chat.DAT	9Mo li	Neuro	290	26	Granule Laye	1285	0,0	15,0	n/a	11498,45	11542,68	11579,73	0,06	0,06	0,064	0,059	10000,0	52900,0
Boma 297 li Neurone Maus chat.DAT	9Mo li	Neuro	179	23	Granule Laye	1201	0,0	14,7	n/a	6959,46	7019,54	7074,87	0,08	0,07	0,081	0,075	10000,0	52900,0
Boma 298 li Neurone Maus chat.DAT	9Mo li	Neuro	357	24	Granule Laye	1248	0,0	16,8	n/a	15898,30	15937,86	15948,16	0,07	0,05	0,056	0,053	10000,0	52900,0
Boma 299 li Neurone Maus chat.DAT	9Mo li	Neuro	308	23	Granule Laye	1222	0,0	15,1	n/a	12276,32	12323,23	12349,52	0,06	0,06	0,058	0,057	10000,0	52900,0

Tabelle 9: „results“, Zählresultate der zeitlichen Analyse (linke Hemisphären)

Boma 279 li Neurone Maus chat..DAT	Vehikel li	Neuro	440	25	Granule Laye	1298	0,0	14,1	n/a	16401,53	16450,85	16460,27	0,05	0,05	0,051	0,048	10000,0	52900,0
Boma 280 li Neurone Maus chat..DAT	Vehikel li	Neuro	333	26	Granule Laye	1474	0,0	14,1	n/a	12407,32	12450,88	12635,62	0,05	0,05	0,057	0,055	10000,0	52900,0
Boma 281 li Neurone Maus chat..DAT	Vehikel li	Neuro	308	25	Granule Laye	1293	0,0	14,5	n/a	11834,61	12136,00	12153,16	0,06	0,06	0,060	0,057	10000,0	52900,0
Boma 283 li Neurone Maus chat..DAT	Vehikel li	Neuro	517	25	Granule Laye	1413	0,0	12,6	n/a	17221,79	17248,92	17346,46	0,05	0,04	0,045	0,044	10000,0	52900,0
Boma 284 li Neurone Maus chat..DAT	Vehikel li	Neuro	247	26	Granule Laye	1444	0,0	12,4	n/a	8098,64	8126,03	8134,57	0,07	0,06	0,066	0,064	10000,0	52900,0
Boma 285 li Neurone Maus chat..DAT	Vehikel li	Neuro	463	26	Granule Laye	1350	0,0	13,7	n/a	16760,55	16800,59	17109,44	0,06	0,05	0,049	0,046	10000,0	52900,0
Boma 287 li Neurone Maus chat..DAT	Vehikel li	Neuro	413	25	Granule Laye	1314	0,0	14,3	n/a	15638,23	15686,20	15821,52	0,06	0,05	0,051	0,049	10000,0	52900,0
Boma 288 li Neurone Maus chat..DAT	Vehikel li	Neuro	421	26	Granule Laye	1354	0,0	13,2	n/a	14735,90	14728,70	14913,91	0,07	0,05	0,050	0,049	10000,0	52900,0
Boma 289 li Neurone Maus chat..DAT	Vehikel li	Neuro	363	26	Granule Laye	1395	0,0	14,1	n/a	13500,95	13491,69	13592,93	0,06	0,05	0,054	0,052	10000,0	52900,0
Boma 318 re Neurone Maus chat..DAT	1Mo re	Neuro	492	25	Granule Laye	1376	0,0	15,1	n/a	19685,82	19705,05	19952,32	0,05	0,05	0,046	0,045	10000,0	52900,0
Boma 319 re Neurone Maus chat..DAT	1Mo re	Neuro	195	26	Granule Laye	1502	0,0	15,0	n/a	7722,61	7759,99	7865,88	0,07	0,07	0,075	0,072	10000,0	52900,0
Boma 320 re Neurone Maus chat..DAT	1Mo re	Neuro	133	26	Granule Laye	1310	0,0	12,8	n/a	4506,19	4536,18	4575,79	0,08	0,09	0,089	0,087	10000,0	52900,0
Boma 321 re Neurone Maus chat..DAT	1Mo re	Neuro	248	26	Granule Laye	1326	0,0	13,4	n/a	8821,52	8848,72	8964,65	0,07	0,06	0,066	0,064	10000,0	52900,0
Boma 322 re Neurone Maus chat..DAT	1Mo re	Neuro	304	25	Granule Laye	1411	0,0	13,0	n/a	10450,53	10560,11	10612,00	0,06	0,06	0,059	0,057	10000,0	52900,0
Boma 323 re Neurone Maus chat..DAT	1Mo re	Neuro	342	25	Granule Laye	1441	0,0	14,1	n/a	12774,43	12987,30	13078,61	0,06	0,05	0,057	0,054	10000,0	52900,0
Boma 324 re Neurone Maus chat..DAT	1Mo re	Neuro	330	25	Granule Laye	1424	0,0	14,8	n/a	12891,09	13001,56	13131,51	0,05	0,05	0,058	0,055	10000,0	52900,0
Boma 325 re Neurone Maus chat..DAT	1Mo re	Neuro	71	21	Granule Laye	1313	0,0	14,4	n/a	2709,21	2800,29	2816,24	0,11	0,12	0,122	0,119	10000,0	52900,0
Boma 326 re Neurone Maus chat..DAT	1Mo re	Neuro	453	23	Granule Laye	1218	0,0	14,8	n/a	17688,67	17763,25	17892,84	0,06	0,05	0,048	0,047	10000,0	52900,0
Boma 327 re Neurone Maus chat..DAT	1Mo re	Neuro	473	26	Granule Laye	1531	0,0	15,4	n/a	19210,41	19331,15	19469,46	0,05	0,05	0,046	0,046	10000,0	52900,0
Boma 328 re Neurone Maus chat..DAT	3Mo re	Neuro	414	25	Granule Laye	1479	0,0	16,0	n/a	17515,71	17575,05	17699,90	0,05	0,05	0,048	0,049	10000,0	52900,0
Boma 329 re Neurone Maus chat..DAT	3Mo re	Neuro	332	24	Granule Laye	1278	0,0	14,3	n/a	12564,88	12564,88	12701,15	0,06	0,06	0,056	0,055	10000,0	52900,0
Boma 330 re Neurone Maus chat..DAT	3Mo re	Neuro	441	24	Granule Laye	1243	0,0	14,4	n/a	16798,40	16821,91	16910,08	0,05	0,05	0,047	0,048	10000,0	52900,0
Boma 331 re Neurone Maus chat..DAT	3Mo re	Neuro	332	23	Granule Laye	1224	0,0	14,7	n/a	12902,12	12886,78	13007,29	0,06	0,06	0,057	0,055	10000,0	52900,0
Boma 333 re Neurone Maus chat..DAT	3Mo re	Neuro	335	25	Granule Laye	1200	0,0	13,8	n/a	12207,19	12220,98	12302,83	0,06	0,05	0,057	0,055	10000,0	52900,0
Boma 334 re Neurone Maus chat..DAT	3Mo re	Neuro	440	24	Granule Laye	1168	0,0	15,0	n/a	17407,78	17395,35	17487,31	0,05	0,05	0,048	0,048	10000,0	52900,0
Boma 335 re Neurone Maus chat..DAT	3Mo re	Neuro	416	23	Granule Laye	1233	0,0	17,6	n/a	19355,82	19391,67	19596,69	0,06	0,05	0,052	0,049	10000,0	52900,0
Boma 336 re Neurone Maus chat..DAT	3Mo re	Neuro	294	23	Granule Laye	1170	0,0	15,6	n/a	12142,21	12079,55	12245,53	0,06	0,06	0,059	0,058	10000,0	52900,0
Boma 337 re Neurone Maus chat..DAT	6Mo re	Neuro	448	25	Granule Laye	1248	0,0	14,2	n/a	16775,68	16775,68	16974,59	0,05	0,05	0,048	0,047	10000,0	52900,0
Boma 338 re Neurone Maus chat..DAT	6Mo re	Neuro	288	27	Granule Laye	1340	0,0	13,6	n/a	10323,35	10313,13	10313,67	0,06	0,06	0,061	0,059	10000,0	52900,0
Boma 340 re Neurone Maus chat..DAT	6Mo re	Neuro	410	26	Granule Laye	1322	0,0	14,3	n/a	15472,61	15467,74	15582,50	0,05	0,05	0,050	0,049	10000,0	52900,0
Boma 341 re Neurone Maus chat..DAT	6Mo re	Neuro	375	24	Granule Laye	1163	0,0	13,3	n/a	13176,92	13227,35	13305,82	0,06	0,05	0,050	0,052	10000,0	52900,0
Boma 342 re.DAT	6Mo re	Neuro	328	19	Granule Laye	1072	0,0	14,1	n/a	12233,78	12416,11	12466,13	0,07	0,06	0,057	0,055	10000,0	52900,0
Boma 343 re Maus chat Neurone.DAT	6Mo re	Neuro	388	26	Granule Laye	1315	0,0	13,0	n/a	13368,53	13424,74	13516,00	0,06	0,05	0,054	0,051	10000,0	52900,0
Boma 344 re Neurone Maus chat..DAT	6Mo re	All Markers	403	27	Granule Laye	1436	0,0	13,1	n/a	13963,06	13963,06	14103,45	0,05	0,05	0,050	0,050	10000,0	52900,0
Boma 346 re Neurone Maus chat..DAT	6Mo re	Neuro	386	26	Granule Laye	1169	0,0	13,8	n/a	14101,76	14095,82	14192,00	0,06	0,05	0,052	0,051	10000,0	52900,0
Boma 290 re Neurone Maus chat..DAT	9Mo re	Neuro	359	26	Granule Laye	1348	0,0	15,2	n/a	14479,15	14484,37	14544,84	0,05	0,05	0,054	0,053	10000,0	52900,0
Boma 291 re Neurone Maus chat..DAT	9Mo re	Neuro	343	22	Granule Laye	1133	0,0	14,2	n/a	12851,21	12860,75	12925,94	0,06	0,05	0,057	0,054	10000,0	52900,0
Boma 292 re Neurone Maus chat..DAT	9Mo re	Neuro	366	24	Granule Laye	1265	0,0	13,5	n/a	13058,65	13036,48	13134,71	0,05	0,05	0,057	0,052	10000,0	52900,0
Boma 293 re Neurone Maus chat..DAT	9Mo re	Neuro	471	23	Granule Laye	1226	0,0	13,6	n/a	16951,46	16925,27	16928,71	0,05	0,05	0,048	0,046	10000,0	52900,0
Boma 294 re Neurone Maus chat..DAT	9Mo re	Neuro	332	26	Granule Laye	1258	0,0	13,2	n/a	11594,72	11601,27	11662,08	0,06	0,06	0,058	0,055	10000,0	52900,0
Boma 297 re Neurone Maus chat..DAT	9Mo re	Neuro	204	24	Granule Laye	1148	0,0	14,2	n/a	7686,43	7722,67	7777,72	0,08	0,07	0,076	0,070	10000,0	52900,0
Boma 298 re Neurone Maus chat..DAT	9Mo re	Neuro	389	22	Granule Laye	1174	0,0	13,6	n/a	13978,13	13939,22	14000,68	0,06	0,05	0,053	0,051	10000,0	52900,0
Boma 299 re Neurone Maus chat..DAT	9Mo re	Neuro	398	21	Granule Laye	1177	0,0	14,1	n/a	14794,22	14763,24	14788,48	0,05	0,05	0,053	0,050	10000,0	52900,0
Boma 279 re Neurone Maus chat..DAT	Vehikel re	Neuro	285	25	Granule Laye	1269	0,0	14,3	n/a	10760,40	10762,37	10886,50	0,07	0,06	0,062	0,059	10000,0	52900,0
Boma 280 re Neurone Maus chat..DAT	Vehikel re	Neuro	308	25	Granule Laye	1430	0,0	15,1	n/a	12265,37	12265,37	12384,58	0,07	0,06	0,060	0,057	10000,0	52900,0
Boma 281 re Neurone Maus chat..DAT	Vehikel re	Neuro	352	25	Granule Laye	1236	0,0	15,2	n/a	14110,68	14108,81	14327,05	0,05	0,05	0,056	0,053	10000,0	52900,0
Boma 283 re Neurone Maus chat..DAT	Vehikel re	Neuro	414	25	Granule Laye	1382	0,0	16,8	n/a	18405,71	18408,73	18514,54	0,05	0,05	0,050	0,049	10000,0	52900,0
Boma 284 re Neurone Maus chat..DAT	Vehikel re	Neuro	365	25	Granule Laye	1288	0,0	16,9	n/a	16281,98	16270,78	16495,94	0,05	0,05	0,057	0,052	10000,0	52900,0
Boma 285 re Neurone Maus chat..DAT	Vehikel re	Neuro	379	24	Granule Laye	1309	0,0	15,4	n/a	15485,58	15402,18	15547,04	0,05	0,05	0,054	0,051	10000,0	52900,0
Boma 287 re Neurone Maus chat..DAT	Vehikel re	Neuro	324	24	Granule Laye	1256	0,0	14,1	n/a	12068,22	12064,75	12145,34	0,06	0,06	0,056	0,058	10000,0	52900,0
Boma 288 re Neurone Maus chat..DAT	Vehikel re	Neuro	297	25	Granule Laye	1308	0,0	13,7	n/a	10744,16	10744,16	10846,42	0,06	0,06	0,062	0,058	10000,0	52900,0
Boma 289 re Neurone Maus chat..DAT	Vehikel re	Neuro	313	24	Granule Laye	1381	0,0	14,2	n/a	11739,60	11764,68	11796,92	0,06	0,06	0,060	0,057	10000,0	52900,0

Tabelle 10: „results“, Zählresultate der zeitlichen Analyse (rechte Hemisphären, Fortsetzung der Tabelle 9)

Univariat

[DatenSet0]

Einfaktorielle ANOVA

VAR00003

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	2,827E+12	5	5,653E+11	8,688	,000
Innerhalb der Gruppen	1,171E+12	18	65071877238		
Gesamt	3,998E+12	23			

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: VAR00003
Bonferroni

(I) VAR00004	(J) VAR00004	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-... Untergrenze
50pg L	100pg L	-788131,000*	161334,283	,002	-1333499,31
	200pg L	-575154,800	213425,195	,222	-1296609,26
	50pg R	14304,000	161334,283	1,000	-531064,31
	100pg R	-669245,400*	161334,283	,009	-1214613,71
	200pg R	-383848,800	213425,195	1,000	-1105303,26
100pg L	50pg L	788131,000*	161334,283	,002	242762,69
	200pg L	212976,200	213425,195	1,000	-508478,26
	50pg R	802435,000*	161334,283	,001	257066,69
	100pg R	118885,600	161334,283	1,000	-426482,71
	200pg R	404282,200	213425,195	1,000	-317172,26
200pg L	50pg L	575154,800	213425,195	,222	-146299,66
	100pg L	-212976,200	213425,195	1,000	-934430,66
	50pg R	589458,800	213425,195	,193	-131995,66
	100pg R	-94090,600	213425,195	1,000	-815545,06
	200pg R	191306,000	255091,900	1,000	-670997,01
50pg R	50pg L	-14304,000	161334,283	1,000	-559672,31
	100pg L	-802435,000*	161334,283	,001	-1347803,31
	200pg L	-589458,800	213425,195	,193	-1310913,26
	100pg R	-683549,400*	161334,283	,007	-1228917,71
	200pg R	-398152,800	213425,195	1,000	-1119607,26
100pg R	50pg L	669245,400*	161334,283	,009	123877,09
	100pg L	-118885,600	161334,283	1,000	-664253,91
	200pg L	94090,600	213425,195	1,000	-627363,86
	50pg R	683549,400*	161334,283	,007	138181,09
	200pg R	285396,600	213425,195	1,000	-436057,86
200pg R	50pg L	383848,800	213425,195	1,000	-337605,66
	100pg L	-404282,200	213425,195	1,000	-1125736,66

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: VAR00003
Bonferroni

(I) VAR00004	(J) VAR00004	95%-... Obergrenze
50pg L	100pg L	-242762,69
	200pg L	146299,66
	50pg R	559672,31
	100pg R	-123877,09
	200pg R	337605,66
100pg L	50pg L	1333499,31
	200pg L	934430,66
	50pg R	1347803,31
	100pg R	664253,91
	200pg R	1125736,66
200pg L	50pg L	1296609,26
	100pg L	508478,26
	50pg R	1310913,26
	100pg R	627363,86
	200pg R	1053609,01
50pg R	50pg L	531064,31
	100pg L	-257066,69
	200pg L	131995,66
	100pg R	-138181,09
	200pg R	323301,66
100pg R	50pg L	1214613,71
	100pg L	426482,71
	200pg L	815545,06
	50pg R	1228917,71
	200pg R	1006851,06
200pg R	50pg L	1105303,26
	100pg L	317172,26

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: VAR00003
Bonferroni

(I) VAR00004	(J) VAR00004	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-... Untergrenze
	200pg L	-191306,000	255091,900	1,000	-1053609,01
	50pg R	398152,800	213425,195	1,000	-323301,66
	100pg R	-285396,600	213425,195	1,000	-1006851,06

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: VAR00003
Bonferroni

		95%-...
(I) VAR00004	(J) VAR00004	Obergrenze
	200pg L	670997,01
	50pg R	1119607,26
	100pg R	436057,86

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Seite 3

Tabelle 11: Statistische Tests zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung

Geräte	Hersteller
Cryostat Jung CM300	Leica, Bensheim/ Jung , Deutschland
Digital ansteuerbarer Objektträgertisch, MT12	Heidenhain, Traunreut, Deutschland
Digitalkamera CX9000 für Durchlichtmikroskopie	MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA
Mikroskop BX 51	Olympus, Tokyo, Japan
Schüttler Standard Analog Shaker	VWR, Darmstadt
Stereotaktischer Apparat	David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA

Tabelle 12: Geräte und Hersteller

Chemikalien und Verbrauchsmaterial	Hersteller
ABC Elite Kits Anti goat, Anti mouse, standard (biotynilierter Sekundärantikörper, Avidin, Biotin)	Vector Laboratories, Camon, Wiesbaden, Deutschland
Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammonium-nickelsulfat Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Botulinumtoxin-A	Quadratech Diagnostics
Deckgläser Menzel Gläser 24 mm x 60 mm	in vitro diagnostic/ Apothekencharge
DePeX	Serva, Heidelberg, Deutschland
Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylenglykol 99%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol 85%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hamilton-Mikrolitherspritze	Carl Roth, Karlsruhe
Normal Rabbit Serum	Vector Laboratories, Southfield, MI, USA
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost© Plus	Thermo Scientific
Pinsel Junior Synthetics, Serie 303, Größe 1 und 2	da Vinci
Propanol	Apothekencharge
Rinderserumalbumin Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Handelsüblicher Zucker
Tissue Freezing Medium©	Tissue Freezing Medium©
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
24-Well- und 48-Well-Gewebekulturschalen Multidish	Greiner bio-one
Xylazin (Rompun©)	Bayer, Deutschland
Xylol	J T Baker, Greisheim, Deutschland

Tabelle 13: Chemikalien und Verbrauchmaterial, Hersteller

		Verdünnung	Hersteller
Primärer Antikörper	ChAT (Ziege)	1:200	Chemicon (Millipore)
Sekundärer Antikörper	Anti-Ziege (Kaninchen)	1:250	Vector

Tabelle 14: Primär- und Sekundärantikörper

Software	Hersteller
Excel	Microsoft
Steuer- und Auswerteprogramm StereoInvestigator, v8.0	MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA

Tabelle 15: verwendete Software

6.2. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit vorher weder in der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock noch in einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Rostock, den 24. April 2017

Sarah Witt

6.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Sarah Witt
Anschrift:	Sattlerstraße 29, 14469 Potsdam
Geburtsdatum:	11.08.1990
Geburtsort:	Potsdam
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Religion:	evangelisch
Familienstand:	ledig, keine Kinder

Ausbildungsdaten

Schulausbildung:	1997-2001
	Grundschule Glindow
	2001-2009
	Schnellläuferklasse, Ernst-Haeckel-
	Gymnasium Werder (Havel)
	Mittlerer Schulabschluss 2006
Abschluss:	27.06.2009
	Allgemeine Hochschulreife
Studium:	WS 2009 Humanmedizin an der Universität Rostock
	2011: 1.Staatsexamen (Physikum) Note 2,0
	2014: 2. Staatsexamen Note 2,0
	2015: 3. Staatsexamen Note 2,0
Berufserfahrung	18.01.16 Assistenzärztin für Chirurgie in der Klinik Sanssouci Potsdam

	01.10.16 Assistenzärztin für Urologie am Ernst-von-Bergmann-Klinikum Potsdam	
Sprachkenntnisse:	Englisch:	Jahrgangsstufe 5 bis Jahrgangsstufe 13
	Französisch:	Jahrgangsstufe 6 bis Jahrgangsstufe 10
	Latein:	Jahrgangsstufe 11 bis Jahrgangsstufe 13
		(mit kleinem Latinum abgeschlossen)
	Spanisch:	1 Semester Hochschulkurs (mit A1 abgeschlossen)

Praktische Erfahrungen und

besondere Kenntnisse:

Grund- und Bronzetauchschein

Führerschein der Klasse B

Freiwillige Feuerwehr Truppmann I, Sprechfunker

7. Thesenblatt

1. Botulinum-Neurotoxin-A ist ein potentes Neurotoxin, welches von Bakterien produziert wird. Wie jedoch schon Paracelsus postulierte „Sola dosis facit venenum“, die Dosis macht das Gift. Daher ist davon auszugehen, dass geringe Dosen nicht toxisch sind.
2. Der Morbus Parkinson ist eine der häufigsten neurodegenerative Erkrankungen.
3. Der Risikofaktor „Alter“ spielt für die Entstehung der Erkrankung vermutlich eine Rolle. Es ist aufgrund des demografischen Wandels mit einer Zunahme der Inzidenz zurechnen.
4. Der Morbus Parkinson beruht auf einem Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra.
5. Die intrastriatale Injektion von Botulinum-Neurotoxin-A hatte hätte vermutlich eine geringere Nebenwirkungsrate als die systemische Applikation von Anticholinergika und stellt somit eine attraktive Therapieoption dar.
6. Die striatale Applikation von BoNT-A kann durch die Antagonisierung des Parkinson-bedingten Hypercholinismus als mögliche Therapie des Morbus Parkinson erwogen werden.
7. Als lokale operative Maßnahmen kommen die Implantation von Tiefenhirnstimulatoren oder eine Thermokoagulation im Thalamus in Betracht.
8. Die cholinergen Interneurone machen 1-3% an der Gesamtneuronenzahl im Striatum der Maus aus.
9. Nach der Injektion lassen sich morphologische Substrate in Form von multiplen vermutlich axonalen ChAT-positiven Schwellungen identifizieren. Diese können als Botulinumtoxin induzierte Varikositäten (BiVs) bezeichnet werden.
10. Durch die unilaterale Injektion von BoNT-A ändert sich die Zahl der cholinergen Neurone im Striatum der Maus nicht signifikant in unterschiedlichen Altersstufen im Vergleich zur jeweils kontralateralen Seite des CPu.
11. Das Körpergewicht und das Gehirngewicht der untersuchten Tiere ändern sich nach intrastriataler Injektion von BoNT-A im zeitlichen Verlauf und nach unterschiedlichen BoNT-Dosen nicht signifikant.
12. Das Volumen des CPu der untersuchten Tiere ändert sich nach intrastriataler Injektion von BoNT-A im zeitlichen Verlauf und nach unterschiedlichen BoNT-Dosen nicht signifikant.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zuallererst Herrn Professor Wree danken, der mir dieses Promotionsthema und Zugang zu einer Vielzahl an Arbeitsmaterialien und Dissertationen ermöglichte. Über die Jahre hat er uns immer wieder motiviert weiter zu arbeiten und nicht den Mut zu verlieren, wenn das Ende der Mühen mal wieder in weiter Ferne rückte.

Er war es auch, der mich mit meiner Mitdoktorandin zusammenführte, ohne deren Unterstützung ich nie soweit gekommen wäre. Geteiltes Leid ist eben halbes Leid und deswegen möchte ich Juliane Spiewok danken, die mit mir durch dick und dünn gegangen ist.

Ich möchte auch Herrn Dr. Hawlitschka danken, der uns bei fast allen Laborarbeiten angeleitet und auch bei noch so vielen Fragen unsererseits nicht die Nerven und die Freundlichkeit verloren hat.

Mein Dank gilt auch Frau Winzer, die uns in vielen Gesprächen unterstützte und viel Arbeit beim Färben abnahm. Gerade nach stundenlanger nahezu geräuschloser Arbeit war es schön, mal eine liebe Stimme zu hören.

Prof. Schmitt hat durch Hilfe bei der stereologischen Auszählung und Beratung bei der Statistik und Auswertung unserer Ergebnisse auch einen großen Teil zum Erfolg unserer Arbeit beigetragen.

Und zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner bedanken, die mich in all der Zeit unterstützten und für mich da waren.

Danke!