

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Storch

Effekte der Tiefen Hirnstimulation im Nucleus subthalamicus
auf die Plastizität des dopaminergen Systems
im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Charlotte Cosima Helf, geb. am 11.08.1994 in Gießen

aus Kiel

Rostock, 2024 (eingereicht)

Verteidigt am 10.06.2025

[ps://doi.org/10.18453/rosdok_id00005163](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005163)

GUTACHTER

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Alexander Storch
Poliklinik und Klinik für Neurologie
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Florian Geßler
Poliklinik und Klinik für Neurochirurgie
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Stefan Liebau
Institut für Neuroanatomie & Entwicklungsbiologie
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

DANKSAGUNG

Ich danke Frau Dr. Kathrin Badstübner-Meeske, Dr. Mareike Fauser, Dr. Franz Markert und Prof. Dr. Storch für die große Unterstützung und Hilfestellungen beim Projekt meiner medizinischen Dissertation. Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Uta Naumann für die Anleitung und Unterstützung beim Arbeiten im Labor.

Danke an meine Familie und Nicolas für ermutigende und aufmunternde Unterstützung, kritische Korrekturen und Anmerkungen zur Dissertationsschrift. Zudem danken möchte ich auch Jenny und Maria für die gute Abwechslung zum Labor- und Arbeitsalltag.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VII
TABELLENVERZEICHNIS.....	VIII
ZUSAMMENFASSUNG.....	IX
I. EINLEITUNG	1
1.1 DAS PARKINSON-SYNDROM.....	1
1.1.1 NOMENKLATUR DES PARKINSON-SYNDROMS	1
1.1.2 VERLAUF UND RISIKOFAKTOREN DES IDIOPATHISCHEN PARKINSON-SYNDROMS	1
1.1.3 ÄTIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DES IDIOPATHISCHEN PARKINSON-SYNDROMS.....	2
1.1.4 DIAGNOSTIK DES IDIOPATHISCHEN PARKINSON-SYNDROMS	6
1.1.5 KONSERVATIVE THERAPIE DES IDIOPATHISCHEN PARKINSON-SYNDROMS	7
1.1.6 GRENZEN DER KONSERVATIVEN THERAPIE.....	8
1.2 DIE TIEFE HIRNSTIMULATION	10
1.2.1 ANWENDUNG DER TIEFEN HIRNSTIMULATION	10
1.2.2 CHRONISCHE EFFEKTE DER TIEFEN HIRNSTIMULATION	12
1.2.3 TIEFE HIRNSTIMULATION UND NEURONALE PLASTIZITÄT	13
1.3 EFFEKTE DER THS AUF DIE NEURONALE PLASTIZITÄT IM TIERMODELL DES IPS.....	14
1.3.1 DAS 6-HYDROXYDOPAMIN-PARKINSONMODELL DER RATTE.....	14
1.3.2 C-FOS – NEURONALE AKTIVITÄT UND SYNAPTISCHE PLASTIZITÄT	16
1.3.3 C-FOS UND DIE TIEFE HIRNSTIMULATION	17
1.4 ZIEL DER PROMOTIONSARBEIT	19
II. MATERIAL UND METHODIK	21
2.1 TIERE, LÄSION UND GRUPPENEINTEILUNG	21
2.1.1 TIERE UND TIERHALTUNG.....	21
2.1.2 6-OHDA-INJEKTION	21
2.1.3 APOMORPHIN-INDUZIERTER ROTATIONSTEST	22

2.2	ELEKTRODENIMPLANTATION, STIMULATION UND PERFUSION	24
2.2.1	ELEKTRODENIMPLANTATION	24
2.2.2	STIMULATIONSEINSTELLUNGEN UND KONTROLLE	25
2.2.3	PERFUSION, KONSERVIERUNG UND LAGERUNG	26
2.3	IMMUNHISTOCHEMIE UND MIKROSKOPIE	27
2.3.1	HIRNREGIONEN	27
2.3.2	GEFRIERSCHNITTE	27
2.3.3	INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG UND ZELLPOPULATIONEN	29
2.3.4	ETABLIERUNG DER C-FOS-FÄRBUNG	29
2.3.5	ABLAUF DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG.....	30
2.3.6	NACHTRÄGLICHE FÄRBUNG ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MIKROGLIA.....	31
2.3.7	MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN.....	31
2.4	QUANTIFIZIERUNG UND STATISTIK.....	33
III.	ERGEBNISSE.....	34
3.1	LÄSIONSKONTROLLE: APOMORPHIN-INDUZIERTER ROTATIONSVERHALTENSTEST	34
3.2	DIE DREI MUSTER DER C-FOS-ANLAGERUNG	35
3.3	EFFEKTE DER THS AUF ANZAHL UND AKTIVIERUNG DER NEURONE DER SNPC.....	38
3.3.1	EFFEKTE DER THS AUF DIE GESAMTZELLZAHL	39
3.3.2	EFFEKTE DER THS AUF DIE NEURONENZAHL.....	40
3.3.3	EFFEKTE DER THS AUF DIE ANZAHL DOPAMINERGER NEURONE	40
3.3.4	EFFEKTE DER THS AUF DIE AKTIVITÄT VON ZELLEN/NEURONEN (C-FOS-POSITIVITÄT). 40	
3.4	EFFEKTE DER THS AUF ANZAHL UND AKTIVIERUNG DER NEURONE DER SNPR.....	42
3.4.1	EFFEKTE DER THS AUF DIE GESAMTZELLZAHL	43
3.4.2	EFFEKTE DER THS AUF DIE NEURONENZAHL.....	44
3.4.3	EFFEKTE DER THS AUF DIE ANZAHL DOPAMINERGER NEURONE	44
3.4.4	EFFEKTE DER THS AUF DIE AKTIVITÄT VON ZELLEN/NEURONEN (C-FOS-POSITIVITÄT). 44	
3.5	EFFEKTE DER THS AUF ANZAHL UND AKTIVIERUNG DER NEURONE DER VTA	46
3.5.1	EFFEKTE DER THS AUF DIE GESAMTZELLZAHL	47
3.5.2	EFFEKTE DER THS AUF DIE NEURONENZAHL.....	47

3.5.3	EFFEKTE DER THS AUF DIE ANZAHL DOPAMINERGER NEURONE	48
3.5.4	EFFEKTE DER THS AUF DIE AKTIVITÄT VON ZELLEN/ NEURONEN (C-FOS-POSITIVITÄT)	48
IV.	DISKUSSION	49
4.1	ZEIGEN LÄSION UND THS EFFEKTE AUF DIE GESAMTZELLZAHL?.....	49
4.2	BEWIRKT DIE THS NEUROPROLIFERATIVE ODER NEUROPROTEKTIVE EFFEKTE?	51
4.3	BEWIRKT DIE THS NEURORESTAURATIVE EFFEKTE IM DOPAMINERGEN SYSTEM?	54
4.4	IST C-FOS EIN MARKER NEURONALER PLASTIZITÄT NACH CHRONISCHER THS?	58
4.4.1	C-FOS TYP I – HETEROGENE C-FOS-ANLAGERUNG	58
4.4.2	C-FOS TYP II – HETEROGENE C-FOS-ANLAGERUNG	59
4.4.3	C-FOS TYP III – HOMOGENE C-FOS-ANLAGERUNG	59
4.5	LIMITATIONEN	61
4.6	FAZIT UND SCHLUSSWORT.....	62
V.	THESEN	63
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	65
VII.	ANHANG	74
7.1	C-FOS⁺ ZELLEN NACH VIERSTÜNDIGER STIMULATION	74
7.2	MATERIALLISTEN	75
7.2.1	MATERIALLISTE OPERATION (GERÄTE)	75
7.2.2	MATERIALLISTE OPERATION (PHARMAKA/CHEMIKALIEN)	77
7.2.3	MATERIALLISTE IMMUNHISTOCHEMIE (GERÄTE).....	78
7.2.4	MATERIALLISTE IMMUNHISTOCHEMIE (CHEMIKALIEN)	79
7.2.5	MATERIALLISTE SOFTWARE.....	81
7.3	PROTOKOLLE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN	82
7.3.1	C-FOS-FÄRBEPROTOKOLL.....	82
7.3.2	IBA-1-FÄRBEPROTOKOLL	84
VIII.	LEBENS LAUF	86
IX.	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	87

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CREB	cAMP response element-binding Protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dopa	Dihydroxyphenylalanin
DDC	Dopa-Decarboxylase
EP	Nucleus entopeduncularis
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GP	Globus pallidus
GPe	Globus pallidus pars externa
GPi	Globus pallidus pars interna
Iba-1	Ionisiertes Calcium-bindendes Adaptormolekül 1
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MVB	Mediales Vorderhirnbündel
NBM	Nucleus basalis Meynert
PPTg	Nucleus pedunculo pontinus tegmentalis
ROI	Region of Interest
Striatum	Corpus striatum
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNpr	Substantia nigra pars reticularis
STN	Nucleus subthalamicus
THS	Tiefe Hirnstimulation
TH	Tyrosinhydroxylase
VTA	Area tegmentalis ventralis
UPDRS	Unified Parkinson's Disease Rating Scale
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: SCHEMA DER PHYSIOLOGISCHEN BASALGANGLIENSCHLEIFE.	3
ABBILDUNG 2: SCHEMA DER PATHOPHYSIOLOGISCHEN BASALGANGLIENSCHLEIFE DES IPS.	4
ABBILDUNG 3: DOPAMINSYNTHESE UND REGULATION DER TYROSINHYDROXYLASE.	6
ABBILDUNG 4: FLUKTUATIONEN EINES IPS-PATIENTEN IM TAGESVERLAUF.	8
ABBILDUNG 5: AUSWIRKUNGEN DER THS AUF DIE BASALGANGLIENSCHLEIFE IM IPS.	11
ABBILDUNG 6: STUDIENDESIGN.	22
ABBILDUNG 7: ELEKTRODENIMPLANTATION.	24
ABBILDUNG 8: SETTING ZUR KONTROLLE VON ELEKTRODE UND STIMULATOR.	25
ABBILDUNG 9: WESENTLICHE HIRNREGIONEN DES EXPERIMENTS.	27
ABBILDUNG 10: ANFERTIGUNG VON GEHIRNSCHNITTEN IM KRYOMIKROTOM.	28
ABBILDUNG 11: KONTROLLE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG VON C-FOS.	29
ABBILDUNG 12: ÜBERSICHTSAUFNAHMEN.	31
ABBILDUNG 13: DARSTELLUNG DER ANALYSESTRATEGIE.	32
ABBILDUNG 14: VERSCHIEDENE ANLAGERUNGSMUSTER VON C-FOS AN DEN ZELLKERN.	35
ABBILDUNG 15: ZEITLICHE DYNAMIK DER NUKLEÄREN C-FOS-KONZENTRATION.	36
ABBILDUNG 16: C-FOS TYP I ⁺ ZELLEN IN KOLOKALISATION MIT DEM MIKROGLIAMARKER IBA-1. .	37
ABBILDUNG 17: SUBSTANTIA NIGRA PARS COMPACTA – DETAILAUFNAHMEN.	38
ABBILDUNG 18: SUBSTANTIA NIGRA PARS COMPACTA – AUSWERTUNG.	39
ABBILDUNG 19: SUBSTANTIA NIGRA PARS RETICULATA – DETAILAUFNAHMEN.	42
ABBILDUNG 20: SUBSTANTIA NIGRA PARS RETICULATA – AUSWERTUNG.	43
ABBILDUNG 21: AREA TEGMENTALIS VENTRALIS – DETAILAUFNAHMEN.	46
ABBILDUNG 22: AREA TEGMENTALIS VENTRALIS – AUSWERTUNG.	47

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: ERGEBNISSE DES APOMORPHIN-INDUZIERTEN ROTATIONSVERHALTENSTESTS. 34

TABELLE 2: QUANTITATIVE ANALYSE VON C-FOS NACH VIERSTÜNDIGER STIMULATION..... 74

ZUSAMMENFASSUNG

In der Therapie des idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS) ist die Tiefe Hirnstimulation (THS) eine etablierte Methode um neuronale Signalstörungen zu kompensieren, welche durch die Degeneration von dopaminergen Neuronen entstehen. Trotz der jahrzehntelangen, klinischen Anwendung von THS in der Therapie des IPS ist bis heute wenig über den zellbiologischen Einfluss der chronischen THS auf dopaminerge Neurone bekannt. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit die Klärung der Auswirkung einer chronischen THS des *Nucleus subthalamicus* (STN) auf die Plastizität des dopaminergen Systems.

Im Versuch wurde ein 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte verwendet. Betrachtet wurden eine stimulierte Versuchsgruppe (STN_{STIM}) sowie eine nicht-stimulierte Kontrollgruppe (STN_{SHAM}). Die unilaterale Läsion aller Versuchstiere erfolgte sechs Wochen vor Beginn der THS, welche unilateral, über sieben Tage in der STN_{STIM}-Gruppe erfolgte. Anschließend wurde mittels Immunhistochemie die Zellzahl und -aktivität dopaminergener Neurone in den Kerngebieten *Substantia nigra pars compacta* (SNpc), *Substantia nigra pars reticulata* (SNpr) und *Area tegmentalis ventralis* (VTA) bestimmt. Die Tyrosinhydroxylase (TH) wurde als Marker für dopaminerge Neurone, c-Fos als Marker neuronaler Aktivität verwendet.

Nach siebentägiger, unilateraler STN-THS konnten signifikant mehr dopaminerge Neurone im Bereich der SNpc, jedoch nicht im Bereich der VTA oder SNpr festgestellt werden. Hinsichtlich der Anzahl an Neuronen führte die STN-THS in keiner der untersuchten Regionen zu einer signifikanten Veränderung. Aufgrund des heterogenen Expressionsmusters von c-Fos erfolgte die Gliederung in drei verschiedenen Typen: c-Fos Typ I, Mikroglia-assoziiert und mit kompakter, zytoplasmatischer Anreicherung, c-Fos Typ II, mit verstreuter zytoplasmatischer und nukleärer Expression und c-Fos Typ III, mit homogener, flächiger Anreicherung im Zellkern. Weder für c-Fos Typ I noch für c-Fos Typ II führte die einwöchige Stimulation zu signifikanten Unterschieden in den untersuchten Regionen. Zellen mit c-Fos Typ III wurden in keiner der untersuchten Regionen festgestellt. Da c-Fos Typ III⁺ Zellen bekannter Weise nach kurzzeitiger Stimulation nachweisbar sind, wurde zur Kontrolle der immunhistochemischen Färbung eine zusätzliche 6-Hydroxydopamin läsionierte, vierstündig stimulierte Kohorte hinzugezogen. Hier zeigten sich c-Fos Typ III⁺ Zellen in allen analysierten Regionen, sodass methodische Ursachen ausgeschlossen werden können.

Zusammenfassend zeigt sich ein signifikanter, stimulierender Einfluss der STN-THS auf die Zellzahl nigraler Zellen des dopaminergen Systems. Eine signifikante Wirkung von STN-THS auf die neuronale Aktivität ergibt sich nicht.

I. EINLEITUNG

1.1 DAS PARKINSON-SYNDROM

1.1.1 NOMENKLATUR DES PARKINSON-SYNDROMS

Der Oberbegriff Parkinson-Syndrom steht für eine Reihe neurologischer Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie (Hacke 2016). Definiert werden diese durch die Verlangsamung oder Abwesenheit von Willkürmotorik (Brady- oder Akinesie), welche mit mindestens einem von drei Kardinalsymptomen auftritt. Diese Kardinalsymptome sind Ruhetremor mit einer Frequenz von vier bis sechs Herz, Starrheit (Rigor) und Haltungsinstabilität (posturale Instabilität; Hacke 2016; Hughes et al. 1992). Fakultativ können noch weitere auch nicht-motorische Symptome auftreten. Hierzu zählen sensorische Störungen wie Hyposmie oder Dysästhesien, vegetative Störungen wie Blutdruck- oder Temperatordysregulation oder auch psychische Symptome wie Depressionen und Schlafstörungen (Kalia et al. 2015).

In Bezug auf die Einteilung der Parkinson-Syndrome unterscheidet die Fachliteratur üblicher Weise in vier Gruppen. Erstens das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS), die klassische Variante des Parkinson-Syndroms, welches mit 75 Prozent den größten Anteil der Parkinson-Syndrome ausmacht (Bandmann et al. 2015). Zweitens die früh-adulte Form des Parkinson-Syndroms, welche mit erheblichen Einschränkungen einhergeht und autosomal-rezessiv durch Mutationen in den Genen *PARK2*, *PINK1* oder auch *DJ1* vererbt wird (Schrag et al. 2006). Drittens die atypischen Parkinson-Syndrome, zu denen zum Beispiel die Demenz vom Lewykörper-Typ, die Multisystematrophie oder auch die progressive supranukleäre Blickparese gehören (Deutschländer et al. 2018; Hacke 2016; Litvan et al. 2003). Viertens sekundär bedingte Parkinson-ähnliche Symptome. Ursächlich sind dabei zum Beispiel Medikamente wie Metoclopramid, Lithium oder Valproinsäure (Hacke 2016; Shin et al. 2012). Zudem können auch Tumore und metabolische Erkrankungen wie Morbus Wilson oder ein Hypoparathyreoidismus parkinsonspezifische Symptome auslösen (Bandmann et al. 2015).

1.1.2 VERLAUF UND RISIKOFAKTOREN DES IDIOPATHISCHEN PARKINSON-SYNDROMS

Das IPS ist nach der Alzheimer-Krankheit die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Es ist durch einen chronischen über Jahrzehnte fortschreitenden Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Hierbei beginnt das IPS typischerweise einseitig und weist auch im Verlauf eine Asymmetrie der motorischen Störungen beider Körperhälften auf (Hacke 2016).

Durchschnittlich 13 Jahre nach Beginn der Erkrankung ist der IPS-Patient ohne Hilfe von außen an das Bett oder den Rollstuhl gebunden (Hoehn et al. 1967; Zhao et al. 2010). 20 Jahre nach Diagnosestellung entwickeln 83 Prozent der Erkrankten eine Demenz (Kalia et al. 2015; Stoker et al. 2018). Insbesondere jüngere Patienten haben ein großes Risiko früh im Verlauf der Erkrankung ihre Selbständigkeit zu verlieren (Bjornestad et al. 2016). Bezüglich der Risikofaktoren zeigt sich, dass Männer häufiger am IPS erkranken als Frauen (Dorsey 2018). Auch Umweltfaktoren wie Rauchen oder Pestizidkontakt können die Wahrscheinlichkeit ein IPS zu entwickeln erhöhen (Stoker et al. 2018). Der zentrale Risikofaktor des IPS ist jedoch das Alter (Collier et al. 2011).

Im Rahmen einer in der *Global Burden of Disease Study* angelegten Analyse aus dem Jahr 2016 lag die maximale Prävalenz zwischen dem 85. und 89. Lebensjahr (Frauen zwei Prozent, Männer sieben Prozent; Dorsey 2018). Die Krankheit tritt typischerweise erst in der zweiten Lebenshälfte auf, wobei nur etwa zehn Prozent der Erkrankten jünger als 50 Jahre sind (Pringsheim et al. 2014). Dies spiegelt sich auch in der Zahl an Neuerkrankungen in Deutschland wider. Betrachtet man die deutsche Gesamtbevölkerung liegt die Inzidenz zwischen 16 bis 20 Erkrankten pro 100.000 Personen (Hacke 2016). Im Vergleich dazu betrug die Inzidenz in der über 50-jährigen Bevölkerung in Deutschland zwischen 2004 und 2010 bis zu 229 Erkrankten pro 100.000 Einwohner (Nerius et al. 2017). Weltweit hat sich die Anzahl der am IPS-Erkrankten in den letzten drei Dekaden von 2,5 Millionen (Stand 1990) auf 6,1 Millionen (Stand 2016) mehr als verdoppelt (Rocca 2018; Savica et al. 2016). Bis zum Jahr 2030 wird aufgrund des demografischen Wandels ein weiterer Anstieg der IPS-Patienten von bis zu 30 Prozent erwartet. Diese prognostizierte Expansion der Erkrankungszahlen in Zusammenschau mit dem langjährigen, chronischen Krankheitsverlauf veranschaulicht die Relevanz des IPS und damit einhergehend die Notwendigkeit von besseren, langfristigen und adäquaten Therapiemethoden, um der Vielzahl an Betroffenen ein weitgehend symptomfreies und normales Leben zu ermöglichen.

1.1.3 ÄTIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DES IDIOPATHISCHEN PARKINSON-SYNDROMS

Zwar wurde das IPS bereits im Jahr 1817 durch den britischen Arzt James Parkinson in seinem *Assay on the Shaking Palsy* beschrieben und ist seit circa 200 Jahren ein zentraler Bestandteil der experimentellen Neurologie, trotzdem bleibt die eigentliche Genese des IPS bis heute ungeklärt (Kalia et al. 2015; Parkinson 2002). Im Gegensatz dazu ist über den pathophysiologischen Grundmechanismus des IPS mehr bekannt.

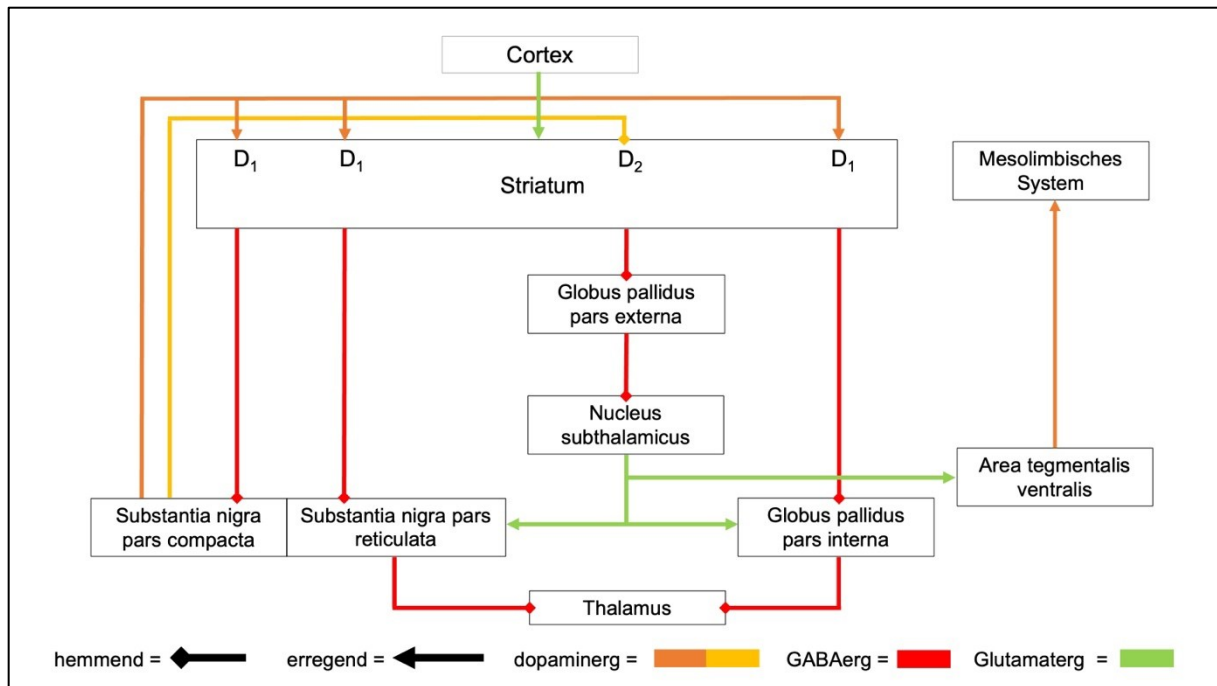


Abbildung 1: Schema der physiologischen Basalganglienschleife. Dargestellt ist die physiologische Verschaltung der Basalganglienschleife, bestehend aus *Globus pallidus pars externa*, *Globus pallidus pars interna*, *Nucleus subthalamicus*, *Striatum*, *Substantia nigra pars compacta*, *Substantia nigra pars reticulata*. Zusätzlich werden die Verbindungen der *Area tegmentalis ventralis*, des *Cortex*, des mesolimbischen Systems und des *Thalamus* aufgeführt. Die Verbindungen werden sowohl hinsichtlich hemmender (Raute) oder erregender (Pfeil) Wirkung, als auch entsprechend des verantwortlichen Neurotransmitters Dopamin (orange), Gamma-Aminobuttersäure (GABA; rot) und Glutamat (grün) dargestellt. In Bezug auf Dopamin wird farblich in eine erregende Verbindung über den D₁-Rezeptor (dunkel orange) und hemmende Verbindung über den D₂-Rezeptor (hell orange) unterschieden. *Adaptiert nach Tafelbildern der Vorlesung für Physiologie, Wintersemester 2015/16, Universität Rostock, von Prof. R. Köhling.*

Pathophysiologisch ursächlich für die charakteristischen motorischen Symptome des IPS ist ein Mangel des Neurotransmitters Dopamin im zentralen Nervensystem (ZNS; Stoker et al. 2018). Dieser Dopaminmangel entsteht durch eine progressive Degeneration dopaminproduzierender (dopaminerg) Neurone der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc), einem Kerngebiet des Mittelhirns (Hacke 2016; Trepel 2021).

Sowohl SNpc als auch *Substantia nigra pars reticulata* (SNpr) bilden zusammen die *Substantia nigra* (SN) und sind Bestandteil der Basalganglienschleife (**Abbildung 1**). Die Basalganglien sind eine Gruppe von Kerngebieten, die unterhalb der Großhirnrinde (*Cortex*), also subkortikal liegt. Zu dieser Gruppe gehören neben der SN, das *Corpus striatum* (*Striatum*), der *Globus pallidus* (GP) und *Nucleus subthalamicus* (STN; Lanciego et al. 2012; Schmitt et al. 2016). Die einzelnen Kerngebiete der Basalganglienschleife stehen über hemmende oder auch stimulierende Nervenfasern, sogenannte Projektionen, in Verbindung (Keeler et al. 2014). Die jeweilige Wirkung ist abhängig vom ausgeschütteten Neurotransmitter sowie vom Rezeptorbesatz der nachgeschalteten Nervenzellen. In der Basalganglienschleife kommen

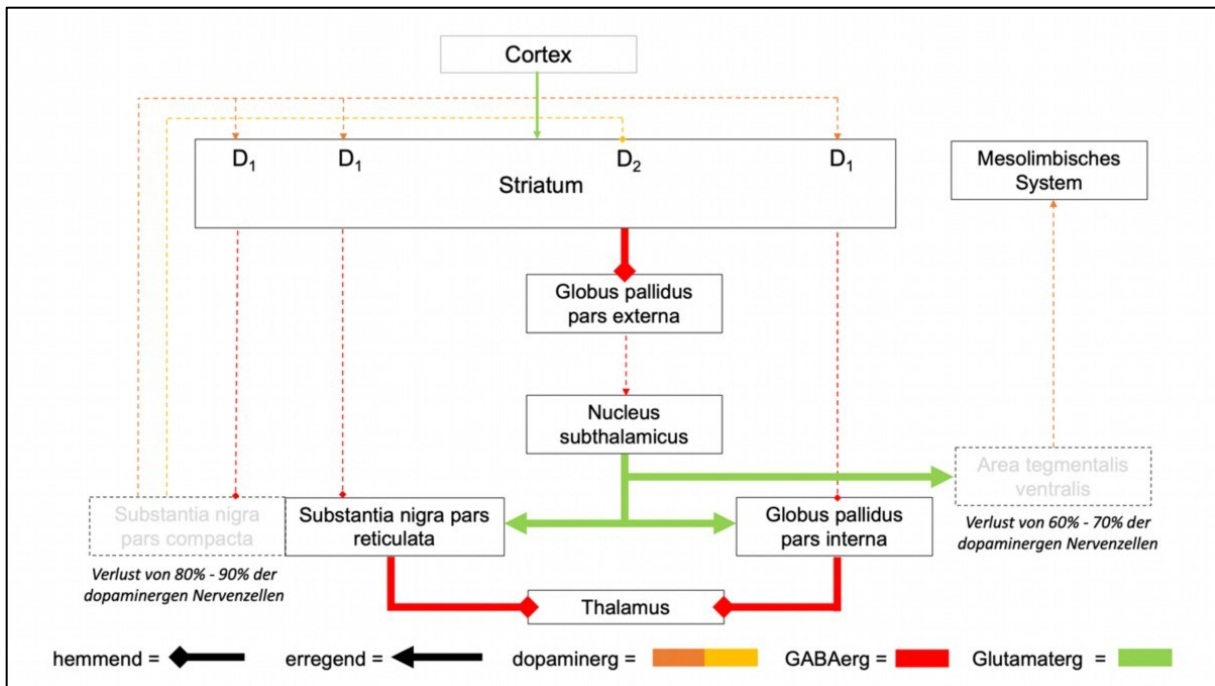


Abbildung 2: Schema der pathophysiologischen Basalganglienschleife des IPS. Dargestellt ist die pathophysiologische Verschaltung der Basalganglienschleife im Rahmen des IPS, bestehend aus *Globus pallidus pars externa*, *Globus pallidus pars interna*, *Nucleus subthalamicus*, *Striatum*, *Substantia nigra pars compacta*, *Substantia nigra pars reticulata*. Zusätzlich werden die Verbindungen der *Area tegmentalis ventralis*, des *Cortex*, des mesolimbischen Systems und des *Thalamus* aufgeführt. Die Verbindungen werden sowohl hinsichtlich hemmender (Raute) oder erregender (Pfeil) Wirkung, als auch entsprechend des verantwortlichen Neurotransmitters Dopamin (orange), Gamma-Aminobuttersäure (GABA; rot) und Glutamat (grün) dargestellt. In Bezug auf Dopamin wird farblich in eine erregende Verbindung über den D₁-Rezeptor (dunkel orange) und hemmende Verbindung über den D₂-Rezeptor (hell orange) unterschieden. Unmittelbar vom Verlust von dopaminergen Nervenzellen betroffene Kerngebiete sind hellgrau hinterlegt. Vom Dopaminmangel betroffene Verbindungen werden gestrichelt dargestellt. Überfunktionelle Verbindungen werden „fett“ dargestellt. *Adaptiert nach Tafelbildern der Vorlesung für Physiologie, Wintersemester 2015/16, Universität Rostock, von Prof. R. Köhling. Abkürzung: IPS – idiopathisches Parkinson-Syndrom.*

hauptsächlich die Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA), Glutamat und Dopamin vor (Trepel 2021). Dopamin hat hierbei eine duale Wirkung, da es über den D₁-Rezeptor stimulierende und über den D₂-Rezeptor hemmende Signale erzeugen kann (Keeler et al. 2014; Ungerstedt et al. 1985).

Eine Aufgabe der Basalganglien besteht in der Verarbeitung von motorischen Informationen, welche zunächst in „grober“ Form vom *Cortex* an das *Striatum* weitergeleitet werden (Lanciego et al. 2012; Trepel 2021). Als Beispiel sei hier der Prozess „der Finger soll zur Nase geführt werden“ genannt. Der *Cortex* initiiert die grobe Bewegung des Arms zur Nase hin. Durch die Basalganglien kommt es jedoch erst zum „Feintuning“, also in welchem Ausmaß, mit welcher Kraft und mit welcher Geschwindigkeit der Arm ausgetreckt werden soll, sodass der Finger auch die Nase trifft.

Durch den im Rahmen des IPS entstehenden Dopaminmangel im Bereich der SNpc wird der Informationsfluss zwischen den einzelnen Kernen der Basalganglienschleife gestört (Caligiore et al. 2016). Es kommt zu einer überschießenden Hemmung von motorischen Signalen durch die Basalganglien (**Abbildung 2**; Trepel 2021). Das Resultat ist der erhöhte Muskeltonus sowie die Brady- oder auch Akinesie des IPS-Patienten (Caligiore et al. 2016). Diese Tonuserhöhung tritt häufig in wechselnder Intensität auf, was bei passiven Bewegungen zu einem ruckartigen Nachgeben der Muskulatur führen kann (Zahnradphänomen; Hacke 2016).

Neben der klassischen Bewegungssymptomatik können sich bei IPS-Patienten auch nicht-motorische Symptome wie Hyposmie, Schlafstörungen, Schmerzen, Demenz oder Depressionen entwickeln (Kalia et al. 2015). Der pathophysiologische Kausalzusammenhang ist die neuronale Degeneration in Kerngebieten außerhalb der Basalganglienschleife (Braak et al. 2003; Hacke 2016). Die entsprechende Reduktion weiterer Neurotransmitter des ZNS wie Acetylcholin, Serotonin oder auch Adrenalin führt dann zur Beeinträchtigung weiterer Funktionen (Hacke 2016). Beispiele für bei IPS-Patienten betroffene Regionen sind der *Nucleus basalis Meynert* (NBM), dessen Dysfunktion mit der Demenz assoziiert ist, oder auch die *Area tegmentalis ventralis* (VTA; Hacke 2016; Healy-Stoffel et al. 2014). Die VTA liegt im Mittelhirn in unmittelbarer, topografischer Nähe zur SN. Ähnlich wie die SNpc findet sich auch in der VTA eine große Anzahl dopaminerger Neurone (van Domburg et al. 1991). Diese Neurone stehen in enger funktioneller Verbindung zu einer Vielzahl von Kerngebieten des ZNS, unter anderem auch zu den Basalganglien (Oades et al. 1987; Schmitt et al. 2012). Im Gegenzug erhält die VTA auch Informationen aus den Basalganglien wie zum Beispiel einen stimulierenden Informationsfluss aus dem STN und hemmende Signale aus dem *Striatum*.

Abgesehen von ihrer Rolle in der motorischen Verschaltung nimmt die VTA auch Einfluss auf Emotionskontrolle und Motivationsentwicklung des Menschen durch direkte Verbindungen zum mesolimbischen System (Oades et al. 1987). Eine Funktionsstörung der VTA ist somit auch wesentliche Ursache für die Entwicklung von nicht-motorischen Symptomen im Rahmen des IPS (Alberico et al. 2015). Sowohl in der VTA als auch in der SN spielt der Neurotransmitter Dopamin eine zentrale Rolle. Dementsprechend ist auch die Dopamin-Synthese ein wichtiger Bestandteil der Parkinsonforschung.

Die Dopamin-Synthese besteht aus zwei chemischen Reaktionen (Haddad et al. 2017; Tabrez et al. 2012). Die erste Reaktion ist eine Hydroxylierung der Aminosäure L-Tyrosin zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) durch die Tyrosinhydroxylase (TH), welche einem eng regulierten Feedbackmechanismus unterliegt und der limitierende Schritt der

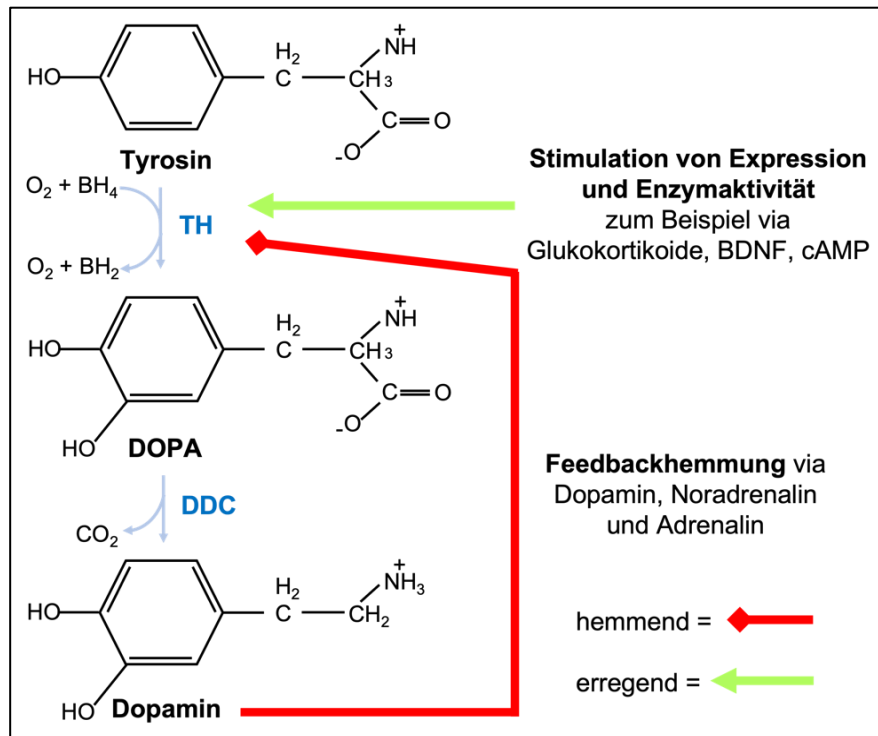


Abbildung 3: Dopaminsynthese und Regulation der Tyrosinhydroxylase. Dargestellt sind die einzelnen Reaktionsschritte der Dopaminsynthese. Die blau aufgeführten, beteiligten Enzyme sind die Tyrosinhydroxylase (TH) und die Dopa-Decarboxylase (DDC). Tyrosin, Dopa und Dopamin sind mit ihren jeweiligen chemischen Strukturformeln dargestellt. Zusätzlich ist der Regulationsmechanismus der Tyrosinhydroxylase aufgeführt. Glukokortikoide, *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) oder auch cAMP stimulieren die Expression und Enzymaktivität von TH. Eine Feedbackhemmung erfolgt durch Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin. Die Stimulation wird durch einen grünen Pfeil am Linienende und die Feedbackhemmung durch eine rote Raute am Linienende gekennzeichnet. *Abkürzungen: cAMP – cyclisches Adenosinmonophosphat, DOPA – Dihydroxyphenylalanin.*

Dopaminsynthese ist (Haavik et al. 1998). Die zweite Reaktion ist eine Decarboxylierung von L-Dopa zu Dopamin, welche durch die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC), auch Dopa-Decarboxylase (DDC) genannt, katalysiert wird (**Abbildung 3**; Bäckström et al. 2018; Tabrez et al. 2012). Da die TH hauptsächlich in dopaminergen Neuronen synthetisiert wird, ist sie besonders vom Verlust dopaminergen Nervenzellen im Rahmen des IPS betroffen (Calvo et al. 2011). Die Dysregulation von Dopamin aufgrund der Degeneration von TH⁺ Neuronen scheint aus diesem Grund im Pathomechanismus des IPS eine wesentliche Rolle zu spielen (Oades et al. 1987; Tabrez et al. 2012).

1.1.4 DIAGNOSTIK DES IDIOPATHISCHEN PARKINSON-SYNDROMS

Im Rahmen der Diagnostik des IPS sollte die Basisdiagnostik zunächst klinisch erfolgen (Hacke 2016; Höglinger G. 2023; Hughes et al. 1992). Neben der genauen neurologischen Untersuchung sind Skalen wie die Hoehn-und-Yahr-Skala oder die *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) wichtige Werkzeuge für Neurologen, um das IPS von

atypischen Parkinson-Syndromen zu unterscheiden (Hoehn et al. 1967; Litvan et al. 2003). Eine solche Unterscheidung ist sowohl für die Prognose als auch für die richtige Therapie der Erkrankung wichtig. Dennoch kann gerade in der Frühphase der Erkrankung nicht immer eine eindeutige Diagnose getroffen werden (Deutschländer et al. 2018; Litvan et al. 2003). Zum Ausschluss möglicher atypischer oder sekundärer Parkinson-Syndrome sollte im Rahmen der Diagnosestellung zumindest einmalig eine Bildgebung des Gehirns erfolgen. Diese ist beim IPS-Patienten meist unauffällig oder zeigt eine unspezifische zerebrale Substanzminderung (Hacke 2016). Ergänzend können zum Beispiel auch quantitative Riechtests oder ein Schellong-Test durchgeführt werden. Denn bereits in der Frühphase des IPS zeigen 80 bis 100 Prozent der Patienten eine Hyposmie und Störungen des autonomen Nervensystems, wie z.B. eine Blutdruckdysregulation (Braak et al. 2003; Hacke 2016; Hughes et al. 1992). In manchen Fällen können unter anderem auch Liquoruntersuchungen oder eine Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT-CT) wegweisende Ergebnisse erbringen. Insbesondere bei jungen Patienten mit starker psychischer Komponente sollte ein Morbus Wilson ausgeschlossen werden (Hacke 2016). Auch die Dopamin Substitution im Rahmen des L-Dopa-Tests kann hilfreiche Aufschlüsse geben. Alternativ zu L-Dopa kann der Dopamin-D₂-Rezeptor-Agonist Apomorphin verwendet werden (Carbone et al. 2019). Im Gegensatz zu den atypischen Parkinson-Syndromen bessern sich Bradykinesie oder auch Rigor von IPS-Patienten nach L-Dopa Gabe (Levin et al. 2016). Jedoch bleiben solche Tests nur unterstützende Werkzeuge neben der eigentlichen klinischen Diagnosestellung. Auch Patienten mit negativem L-Dopa- oder Apomorphin-Test können von einer medikamentösen Therapie mit L-Dopa oder Apomorphin profitieren (Hacke 2016).

1.1.5 KONSERVATIVE THERAPIE DES IDIOPATHISCHEN PARKINSON-SYNDROMS

Die Therapie des IPS sollte frühzeitig begonnen werden und an das Alter sowie an motorische und andere fakultative Symptome des Patienten angepasst sein. Im Zentrum stehen die Verzögerung der Pflegebedürftigkeit und die Erhaltung der Lebensqualität des IPS-Patienten (Hacke 2016). Initial wird heute bei unter 70-jährigen Parkinsonpatienten ohne wesentliche Vorerkrankungen eine Therapie mit einem langwirksamen Dopamin-D₂-Rezeptor-Agonisten (DA) wie zum Beispiel Pramipexol eingeleitet. Nebenwirkungen der DA sind zum Beispiel Übelkeit, Impulskontrollstörungen, vermehrte Tagesmüdigkeit, pulmonale und endokardiale Fibrosen (Armstrong et al. 2020). Aufgrund des Nebenwirkungsprofils von DA wird bei älteren multimorbiden IPS-Erkrankten auf eine medikamentöse Behandlung mit L-Dopa in Kombination mit einem peripher wirksamen Decarboxylase-Hemmer gesetzt (Hacke 2016). Eine direkte orale Substitution von Dopamin ist nicht möglich, da Dopamin im Gegensatz zu L-Dopa nicht Blut-Hirn-Schranken-gängig ist. Peripher wirksame Decarboxylase-Hemmer

verhindern den vorzeitigen Abbau von L-Dopa außerhalb des ZNS (Haddad et al. 2017). Auch Physiotherapie, Logopädie oder Ergotherapie können für den IPS-Patienten wichtig sein, um die Funktionalität des Körpers im Alltag so lange wie möglich aufrechtzuerhalten (Ramig et al. 2018; Domingos et al. 2018). Des Weiteren sollte auch versucht werden nicht-motorische Symptome, die bei 83 Prozent der IPS-Patienten auftreten, adäquat zu therapieren. Für die Demenz im Rahmen des IPS ist zum Beispiel der Cholinesterasehemmer Rivastigmin als Therapie zugelassen, jedoch ist die medikamentöse Therapie nicht-motorischer Symptome des IPS insgesamt eher schwierig (Kalia et al. 2015).

1.1.6 GRENZEN DER KONSERVATIVEN THERAPIE

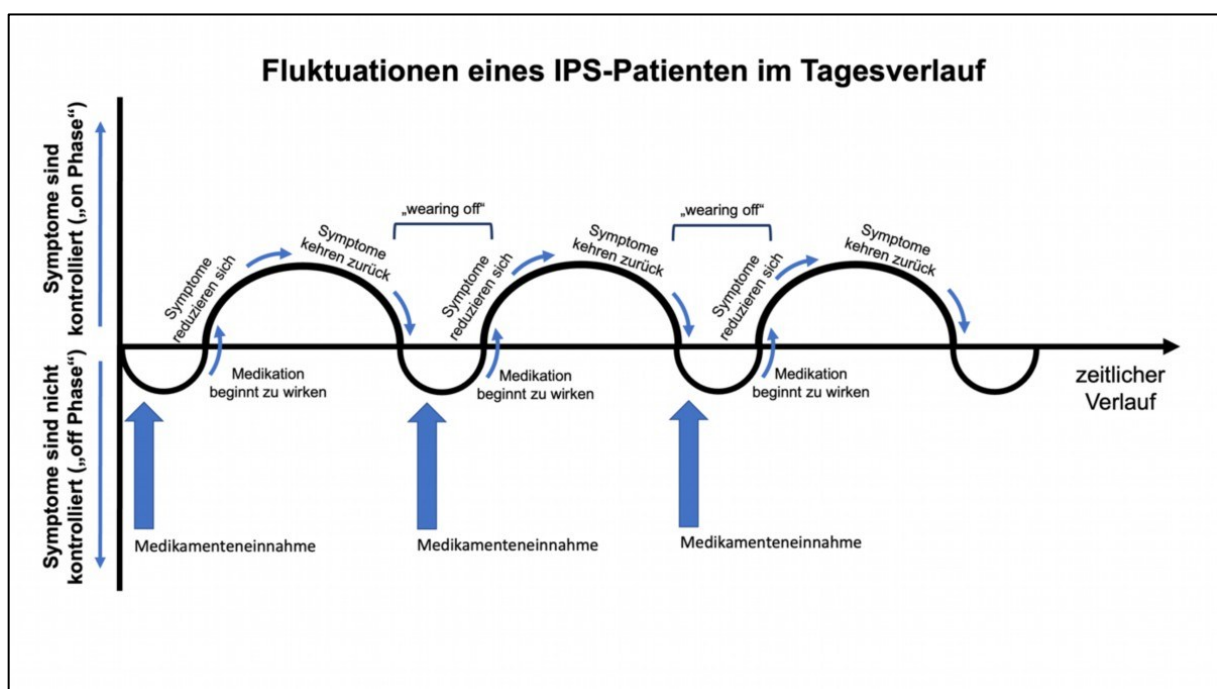


Abbildung 4: Fluktuationen eines IPS-Patienten im Tagesverlauf. In der Grafik ist der zeitliche Verlauf zwischen guter Beweglichkeit (On-Phase) und einem Zustand der rigiden Akinesie eines IPS-Patienten (Off-Phase) mit fortgeschrittenem IPS dargestellt. Diese Fluktuationen stehen in zeitlichem Zusammen mit der Einnahme der Parkinsonmedikation. Das Hinübergleiten in die Off-Phase und die anschließende Besserung nach der Medikamenteneinnahme wird als *wearing off* bezeichnet. Als Grundlage für diese Grafik diente die unter Parkinson Europe zu findende grafische Abbildung des *wearing off* (<https://www.parkinsonseurope.org/about-parkinsons/symptoms/motor-symptoms/wearing-off-and-motor-fluctuations/>, Stand: 18.06.2023). Abkürzung: IPS – idiopathisches Parkinson-Syndrom.

Limitiert wird die medikamentöse Therapie des IPS durch das Auftreten von Fluktuationen im Verlauf der Therapie (Hacke 2016; Werner Poewe 2019). Der Begriff Fluktuation steht für den Wechsel zwischen guter Beweglichkeit (On-Phase) und einem Zustand der rigiden Akinesie des IPS-Patienten (Off-Phase). Jedoch zeigen auch nicht-motorische Symptome L-Dopa-abhängige Fluktuationen (Kalia et al. 2015). Die meisten Erkrankten bemerken fünf bis zehn

Jahre nach Beginn der Erkrankung deutliche On-Off-Zustände (Hacke 2016). Ein Grund für diese Fluktuationen ist der zunehmende Verlust an dopaminergen Nervenzellen. Dadurch bedingt sinkt auch die basale Konzentration an Dopamin im ZNS. Es müssen immer höhere Konzentrationen von L-Dopa zugeführt werden, dessen Wirkspiegel bedingt durch die kurze Halbwertszeit von etwa drei Stunden über den Tag deutlich schwankt (Armstrong et al. 2020). Es kommt so zum sogenannten *wearing off*, welches das Hineingleiten in den Off-Zustand des IPS-Patienten zwischen zwei L-Dopa Gaben beschreibt (**Abbildung 4**; Werner Poewe 2019).

Um kontinuierliche Konzentrationsspiegel von L-Dopa zu erreichen, können neben der oralen Gabe auch subkutane Anwendungen von Apomorphin (Pflaster oder Fertigspritzen) oder eine Applikation als Gel erfolgen (Armstrong et al. 2020; Fernandez et al. 2018; Katzenschlager et al. 2018). Jedoch sind auch diesen Therapieoptionen Grenzen gesetzt. Bedingt durch eine hohe Dosierung von L-Dopa kann eine Hyperkinesie in der Extremitätenmuskulatur sowie der Muskulatur im Hals- und Gesichtsbereich auftreten, sodass geordnete Bewegungsabläufe für den IPS-Patienten unmöglich werden. Auch Psychosen, exzessive Tagesmüdigkeit oder Tachykardien können durch eine Überdosierung von L-Dopa entstehen und eine Dosisreduktion notwendig machen (Hacke 2016; Kalia et al. 2015). Zusätzlich treten Fluktuationen bei langjährigen IPS-Patienten auch unabhängig vom Wirkspiegel auf, sodass Patienten innerhalb von Sekunden zwischen On- und Off-Zuständen wechseln, was ein normales Alltagsleben nahezu unmöglich macht (Hacke 2016).

1.2 DIE TIEFE HIRNSTIMULATION

1.2.1 ANWENDUNG DER TIEFEN HIRNSTIMULATION

In Fällen von ausgeprägter Fluktuation bietet die Tiefe Hirnstimulation (THS) eine etabliert, alternative Therapiemöglichkeit des IPS (Rodriguez-Oroz et al. 2005). Bereits in den 1950er und 1960er Jahren wurden ablative, neurochirurgische Verfahren zur Therapie des IPS angewandt, jedoch nur mit mäßigem Erfolg. Aufgrund der bahnbrechenden Therapieerfolge durch L-Dopa, verlor die THS im Rahmen der IPS-Behandlung zunächst an Bedeutung. Erst mit dem zunehmenden Aufkommen von L-Dopa resistenten IPS-Patienten nach einer L-Dopa Langzeittherapie in den 1980er Jahren gewann die THS wieder an Bedeutung (Schwalb et al. 2008). Nach der Entwicklung von intrakraniell implantierbaren Elektroden und Anwendung der THS bei L-Dopa resistenten IPS-Patienten im Rahmen von Studien folgte im Jahr 1997 die Zulassung des Verfahrens auf dem amerikanischen Markt durch die *Food and Drug Administration* (Gardner 2013). In den ersten zehn Jahren nach der Zulassung wurden bereits über 40.000 IPS-Patienten mittels THS therapiert (Schwalb et al. 2008).

Für eine THS kommt jedoch nicht jeder IPS-Patient in Frage. Als Kontraindikationen gelten Demenz, Depression sowie andere relevante somatische Komorbiditäten. Des Weiteren muss es sich um eine auf Dopamin ansprechende Form des Parkinson-Syndroms handeln. Laut der deutschen Leitlinie für das IPS sollten sich initial eine Verbesserung um mindestens 33 Prozent des UPDRS III nach L-Dopa-Gabe gezeigt haben (Hacke 2016; Höglinger G. 2023). Auch sollten die medikamentösen Therapieoptionen ausgeschöpft sein, da es sich um einen operativen Eingriff handelt, der mit Risiken wie Wundinfektionen, intrakraniellen Blutungen und letztendlich auch dem Tod verbunden sein kann (Höglinger G. 2023). Die Mortalität des Eingriffs liegt in Deutschland laut multizentrisch geführten Studien bei ungefähr 0,4 Prozent (Voges et al. 2007). Insbesondere bei jüngeren Patienten, die das sechste Lebensjahrzehnt noch nicht überschritten haben und bereits frühzeitig nach dem Beginn einer medikamentösen Therapie unter Fluktuationen oder Dyskinesien leiden, ist laut aktueller Studienlage eine THS sinnvoll (Hanna et al. 2018; Krause et al. 2022; Schuepbach et al. 2013). Voraussetzung sollte in diesem Fall ein sehr gutes initiales Ansprechen der Symptome auf L-Dopa sein (> 50 Prozent des UPDRS III; Hacke 2016). Gerade diese Patientengruppe profitiert im Vergleich zur medikamentösen Therapie besonders von der THS durch eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität und Alltagsfunktionalität (Schuepbach et al. 2013).

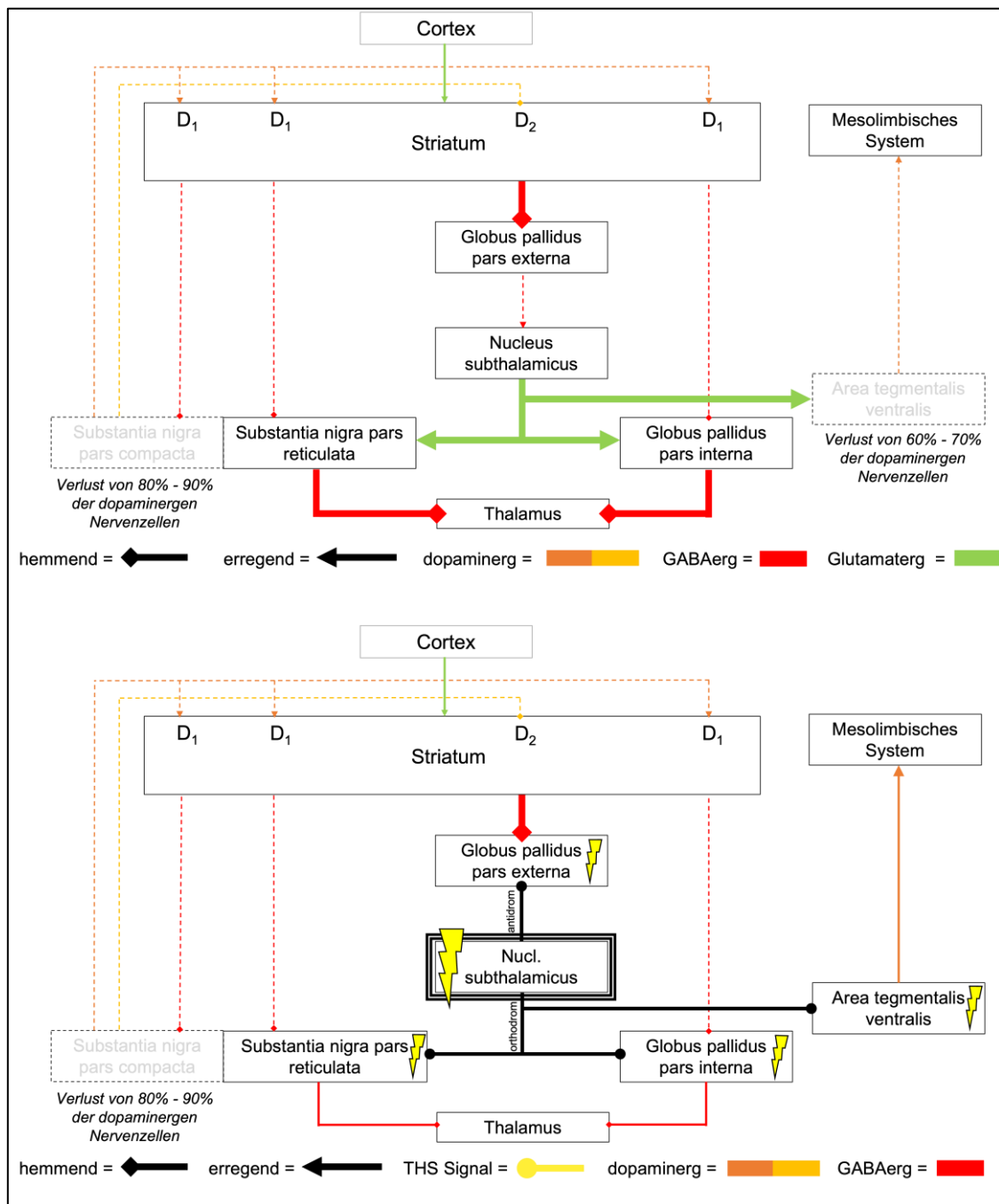


Abbildung 5: Auswirkungen der THS auf die Basalganglienschleife im IPS. Dargestellt ist die pathophysiologische Verschaltung der Basalganglienschleife im Rahmen des IPS, bestehend aus *Globus pallidus pars externa*, *Globus pallidus pars interna*, *Nucleus subthalamicus* (STN), *Striatum*, *Substantia nigra pars compacta*, *Substantia nigra pars reticulata*. Zusätzlich werden die Verbindungen der *Area tegmentalis ventralis*, des *Cortex*, des mesolimbischen Systems und des *Thalamus* aufgeführt. Die Verbindungen werden sowohl hinsichtlich hemmender (Raute) oder erregender (Pfeil) Wirkung, als auch entsprechend des verantwortlichen Neurotransmitters Dopamin (orange), Gamma-Aminobuttersäure (GABA; rot) und Glutamat (grün) dargestellt. In Bezug auf Dopamin wird farblich in eine erregende Verbindung über den D₁-Rezeptor (dunkel orange) und hemmende Verbindung über den D₂-Rezeptor (hell orange) unterschieden. Unmittelbar vom Verlust von dopaminergen Nervenzellen betroffene Kerngebiete sind hellgrau hinterlegt. Vom Dopaminmangel betroffene Verbindungen werden gestrichelt dargestellt. Überfunktionelle Verbindungen werden „fett“ dargestellt. Eigentlicher Stimulationsort ist der STN. Das THS-Signal wird als schwarze Linie mit einem Kreis am Endpunkt dargestellt. Die stimulierten Kerngebiete sind mit einem Blitz gekennzeichnet. *Adaptiert nach Tafelbildern der Vorlesung für Physiologie, Wintersemester 2015/16, Universität Rostock, von Prof. R. Köhling. Abkürzungen: IPS – idiopathisches Parkinson-Syndrom, THS – Tiefe Hirnstimulation.*

Im Rahmen der THS bei IPS-Patienten werden intrakraniell implantierbare Elektroden operativ in Kerngebiete der Basalganglienschleife eingebracht. Ziel sind häufig entweder der STN oder der *Globus pallidus pars interna* (GPi; Rodriguez-Oroz et al. 2005). Die eingebrachten Elektroden wirken mit Standardstimulationsparametern auf die Nervenzellen des Kerngebiets ein. Die genaue Bestimmung der einzelnen Stimulationsparameter ist komplex, da sich einzelne Kerngebiete in den Stimulationsparametern unterscheiden und eine genaue Platzierung der Elektroden im betreffenden Kerngebiet notwendig ist (Volkman et al. 2006). Typische Parameter der monopolaren, chronischen Stimulation sind eine Spannung von 2,5 bis 3,5 Volt, eine Impulsdauer von 60 bis 90 μ s und eine Frequenz von 110 bis 170 Herz (Ramasubbu et al. 2018). Dies kann verschiedene kurzzeitige therapeutische Effekte hervorrufen (Voges 2018): Erstens Einbringung eines neuen Rhythmus in die Basalganglienschleife, der orthodrom fortgeleitet wird. Zweitens eine Blockade von Signalen vorgeschalteter Kerngebiete, die im Rahmen des IPS dysfunktional arbeiten, durch eine antidrome Weiterleitung des Elektrodensignals. Daraus resultiert eine Reduktion der überschießenden, hemmenden Wirkung der Basalganglien, die durch den Dopaminmangel in der SNpc entsteht. Das sichtbare Ergebnis ist die innerhalb von Sekunden bis Minuten eintretende Besserung von Bradykinese und Tremor des IPS-Patienten (**Abbildung 5**).

1.2.2 CHRONISCHE EFFEKTE DER TIEFEN HIRNSTIMULATION

Weiterführend scheint die THS auch langfristige Effekte beziehungsweise Effekte mit längerer Latenz bis zum Wirkungseintritt hervorzurufen. So bessern sich Gangunsicherheit und posturale Instabilität des IPS-Patienten noch Wochen nach dem Therapiebeginn (Shin et al. 2012; Voges 2018). Die Besserung von nicht-motorischen Symptomen ist im Gegensatz zu den positiven motorischen Effekten nicht unmittelbar nach dem Einschalten der THS für den IPS-Patienten spürbar, sondern tritt erst mit einer Latenz von einigen Tagen bis Wochen ein. Dafür bessern sich nicht-motorischen Symptome noch Monate nach Beginn der THS (Dafsari et al. 2016; Georgiev et al. 2021). Für die Mechanismen dieser progressiven Verbesserungen nach THS bestehen aktuell mehrere Hypothesen. Zum einen wird vermutet, dass durch die dauerhafte Stimulation im Rahmen der THS die neuronale Plastizität angeregt wird (van Hartevelt et al. 2014). Zum anderen wird vermutet, dass auch Gliazellen des ZNS durch eine langfristige und kontinuierliche Stimulation erregt werden. Glia- und Nervenzellen stehen in enger metabolischer Homöostase zueinander. THS scheint eine schnellere intrazelluläre Aufnahme von Neurotransmittern in die Gliazellen nach einer exzessiven neuronalen Ausschüttung sowie eine verringerte Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Gliazellen zu fördern. Dementsprechend wird angenommen, dass sich die THS langfristig stabilisierend auf Neurotransmitter- und Zytokinkonzentration auswirkt (Fenoy et al. 2014; Voges 2018).

Gliazellen des ZNS können in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia gegliedert werden. Die Astrozyten bilden das Stützgewebe des ZNS und sind an der Formung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Jäkel et al. 2017). Die Oligodendrozyten bilden die Isolationsschicht der Nervenzellen. Die Mikroglia sind wesentlicher Bestandteil von immunologischen Vorgängen des ZNS. Sie können Antigene präsentieren, betreiben Phagozytose nach traumatischem Zelluntergang, sind mitverantwortlich für die Zusammensetzung des extrazellulären Milieus und stehend in enger metabolischer Homöostase mit den Nervenzellen (Jäkel et al. 2017). Aufgrund dieser engen metabolischen Verknüpfung zwischen Neuronen und Gliazellen erscheint es jedoch nur logisch, dass diese Homöostase einen maßgeblichen Einfluss auf die neuronale Plastizität ausübt.

1.2.3 TIEFE HIRNSTIMULATION UND NEURONALE PLASTIZITÄT

Neuronale Plastizität beschreibt die Fähigkeit des Nervensystems sich langfristig funktionell und strukturell an intrinsische und extrinsische Stimuli anzupassen (Cramer et al. 2011). Dies geschieht durch die Bildung von neuen synaptischen Verbindungen, Änderungen der Transmitterausschüttung oder auch durch die Beeinflussung der Genregulation durch Veränderungen der Transkriptionsfaktorsynthese. Die neuronale Plastizität ist somit zentraler Bestandteil von physiologischen Funktionen des Nervensystems wie dem Erlernen von Sprache oder auch motorischen Fähigkeiten. Auch im pathophysiologischen Kontext spielt die neuronale Plastizität eine wesentliche Rolle, da diese im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen wie dem IPS durch die neuronale Degeneration eingeschränkt wird oder ganz zum Erliegen kommt. Die THS bietet eine vielversprechende Möglichkeit durch die chronische Beeinflussung der neuronalen Aktivität einen stimulierenden Einfluss auf die neuronale Plastizität auszuüben (van Hartevelt et al. 2014). Da sich nicht-motorische Symptome des IPS wie Depression, Demenz oder auch Schlafstörungen noch Jahre nach dem Beginn der THS in IPS-Patienten bessern können, sprechen gerade diese Veränderungen für einen langfristigen THS-Effekt auf die neuronalen Netzwerke (Georgiev et al. 2021). Jedoch ist die Erforschung solcher THS-Effekte im IPS-Patienten aufgrund der Latenz bis zum Wirkungseintritt, hoher technischer Anforderungen und der notwendigen Patient compliance schwierig. Aus diesem Grund ist aktuell weiterhin wenig über die Auswirkungen der THS auf die neuronale Plastizität des Gehirns eines IPS-Patienten bekannt, obwohl die THS bereits seit Jahrzehnten bei IPS-Patienten angewendet wird und als feste Therapieoption in der deutschen Leitlinie aufgeführt ist (Hacke 2016; Höglinger G. 2023). In diesem Zusammenhang bieten Tierversuchsmodelle die Möglichkeit unabhängig von IPS-Patienten motorische Symptome des IPS, Auswirkungen der THS sowie die Veränderungen auf zellulärer Ebene zu untersuchen (Fauser et al. 2021; Faust et al. 2021; Spieles-Engemann et al. 2010).

1.3 EFFEKTE DER THS AUF DIE NEURONALE PLASTIZITÄT IM TIERMODELL DES IPS

1.3.1 DAS 6-HYDROXYDOPAMIN-PARKINSONMODELL DER RATTE

Heutzutage werden zu 48 Prozent Ratten und zu 37 Prozent Mäuse für Tierversuchsmodelle des IPS verwendet, jedoch kommen auch Hamster und Primaten in Frage. Um den Untergang nigro-striataler, dopaminerger Neurone herbeizuführen, werden sowohl Neurotoxine als auch genetische Alterationen der *PARK* Gene genutzt (Stoker et al. 2018).

Ein weitverbreitetes Neurotoxin zur gezielten Läsion nigro-striataler, dopaminerger Nervenzellen ist 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP; Stoker et al. 2018). MPTP erzeugt nach systemischer Gabe eine schnelle beidseitige Degeneration von dopaminergen Neuronen, was in starken motorischen Symptomen resultiert. Es wurde im Jahr 1983 nach dem Auftreten von Parkinson-Syndromen bei mehreren Suchtpatienten durch die unsachgemäße Herstellung von Opioiden entdeckt (Langston et al. 1983). Es kann in Mäusen und Primaten verwendet werden. Ratten sind gegenüber MPTP resistent (Stoker et al. 2018). Ein weiteres häufig angewandtes Neurotoxin ist 6-Hydroxydopamin (6-OHDA; Kirik et al. 1998). Es ist strukturell verwandt mit Dopamin und wirkt daher sehr selektiv auf dopaminerge Neurone, da es durch den gleichen Dopamintransporter aufgenommen wird. Durch die Aufnahme von 6-OHDA wird eine Blockade der Atmungskette in Mitochondrien induziert. Dies führt zu Energiemangel und der intrazellulären Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, was folglich den Zelltod des Neurons herbeiführt (Rodriguez-Pallares et al. 2007). Der genaue Mechanismus der 6-OHDA-Toxizität ist jedoch noch nicht endgültig geklärt. Interessanterweise ist der Grad der Degeneration in unterschiedlichen dopaminergen Kerngebieten unterschiedlich hoch (Masini et al. 2021). So erzeugt die Anwendung von 6-OHDA im Bereich der SNpc eine dopaminerge Degeneration von 90 Prozent, im Bereich der VTA liegt der Grad der dopaminergen Degeneration lediglich bei 30 bis 80 Prozent (Masini et al. 2021; Kirik et al. 1998). Diese unterschiedliche Vulnerabilität liegt daran, dass dopaminerge Neurone der VTA reaktive Sauerstoffspezies besser verstoffwechseln können als nigrale, dopaminerge Neurone (Dias et al. 2013).

Ähnlich wie Dopamin kann auch 6-OHDA die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden (Stoker et al. 2018). Um ein Parkinsonmodell zu generieren, muss 6-OHDA aus diesem Grund direkt intrakraniell injiziert werden (Kirik et al. 1998). Die einseitige Injektion von 6-OHDA bietet die Möglichkeit durch Asymmetrie der motorischen Symptome die Stärke der Degeneration zu untersuchen (Metz et al. 2005). Das 6-OHDA-Parkinsonmodell (6-OHDA-Modell) wird aufgrund der oft einseitig gesetzten Läsion auch 6-OHDA-Hemiparkinson-Modell genannt.

Durch die Gabe von Apomorphin wird ein Rotationsverhalten im Tier induziert, wobei die Anzahl an linksseitigen Drehungen gegenüber den rechtsseitigen Drehungen direkt mit der Stärke der einseitigen Degeneration der SN korreliert (Metz et al. 2005). Eine geringe Wirkung auf die kontralaterale Hemisphäre nach unilateraler Applikation von 6-OHDA kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Henning et al. 2008). Um die Genauigkeit der gezielten Injektion zu erhöhen, wird diese mit Hilfe eines stereotaktischen Rahmens vorgenommen. Ähnlich wie bei neurochirurgischen Operationen wird hierbei die Lokalisation der Kerngebiete über genaue Koordinaten in einem dreidimensionalen Koordinatensystem angegeben (Paxinos et al. 2006). Übliche Zielpunkte der 6-OHDA Injektion sind die SNpc, das *Striatum* oder auch das mediale Vorderhirnbündel (MVB; Masini et al. 2021). Je nach Lokalisation der 6-OHDA Injektion wird ein unterschiedlich schneller Ablauf der dopaminergen Degeneration im Tiermodell erzeugt. Wird 6-OHDA direkt in die SNpc injiziert, beginnt innerhalb von 24 Stunden die Degeneration und führt innerhalb von wenigen Tagen zum Verlust von über 90 Prozent der nigro-striatalen Neurone (Stoker et al. 2018). Das Absterben der Neurone passiert hierbei eher ungeordnet in Form von Nekrosen (Dauer et al. 2003). Wird 6-OHDA in das *Striatum* eingespritzt, kommt es zu einem retrograden Absterben der Nervenzellen über ein bis drei Wochen im Rahmen einer Apoptose (Masini et al. 2021). Die Applikation in das MVB generiert innerhalb von drei bis fünf Wochen einen fast vollständigen Verlust an neuronalen Fasern und Zellkörpern der nigro-striatalen Neurone (Masini et al. 2021). Durch diese Arten der Applikation werden Modelle des fortgeschrittenen IPS generiert (Yuan et al. 2005). Neben den Nervenzellen werden auch die Gliazellen in unterschiedlichem Ausmaß je nach Ort der 6-OHDA-Applikation beeinflusst (Henning et al. 2008). So konnten Henning et al. eine deutlich gesteigerte Aktivität von Astroglia in der SNpc nach einer Injektion von 6-OHDA in das MVB nachweisen. Auch bei Mikroglia konnte eine vermehrte Aktivität in der SNpc nach der Injektion von 6-OHDA in das MVB festgestellt werden. Diese Aktivierung der Gliazellen resultiert aus der 6-OHDA induzierten neuronalen Degeneration.

Insbesondere in den letzten Jahrzehnten wurde mit Hilfe von Tiermodellen der Effekt der THS auf das IPS analysiert. Herkömmliche Versuchstiere des 6-OHDA-Modell sind hierbei zum Beispiel Ratten (Stoker et al. 2018). Neben den unmittelbar eintretenden motorischen Effekten rücken auch die Effekte der THS mit längerer Latenz bis zum Wirkungseintritt in den Vordergrund. Beispielsweise sind die Besserung von nicht-motorischen Symptomen und die Induktion von neuronaler Plastizität nach THS aktuell ein intensiver Forschungsschwerpunkt der experimentellen Parkinsonforschung. Da THS-Effekte mit langer Latenz häufig erst nach einigen Tagen bis Wochen einsetzen, ist auch im Tiermodell eine ausreichend lange Stimulationsdauer von mehreren Tagen erforderlich. Wie bereits dargelegt, bietet das 6-OHDA-Modell der Ratte eine praktikable Möglichkeit, um die Auswirkungen der THS im IPS in

langfristig angelegten experimentellen Studien zu untersuchen. Solche Studien wurden jedoch in der Vergangenheit aufgrund von hohen technischen Anforderungen wie zum Beispiel miniaturisierte Elektroden und Stimulator-Systeme sowie komplexe Operationsabläufe oder auch aufgrund der hohen Belastung für die Versuchstiere durch externe Systeme und lange Stimulationsdauer nur selten durchgeführt. In einer experimentellen Studie von Fauser et al. über die STN-THS im 6-OHDA-Modell der Ratte konnte gezeigt werden, dass nach STN-THS signifikant mehr dopaminerge Neurone auftraten als in der Kontrollgruppe. Neurorestaurative Effekte nach STN-THS wurden nicht nur im Bereich der Basalganglienschleife, sondern auch im mesolimbischen System festgestellt. Neben der STN-THS wurden auch Effekte nach THS des *Nucleus entopeduncularis* (EP), der das Äquivalent des GPi im Menschen darstellt, durch Fauser et al. untersucht. Interessanterweise konnten positive Effekte auf nicht-motorische Symptome und neuronale Plastizität nur nach STN-THS jedoch nicht nach EP-THS festgestellt werden (Fauser et al. 2021). Auch Spieles-Engemann et al. konnten ähnliche neuroprotektive Ergebnisse nach STN-THS im 6-OHDA-Modell der Ratte in Bezug auf nigrale, dopaminerge Neurone nachweisen (Spieles-Engemann et al. 2010). Eine deutliche Limitation der Studie ist jedoch, dass im anhaltend neurodegenerativen Prozess des Toxins stimuliert wurde. Erklärungen für die stimulierende Wirkung von STN-THS könnten die Anregung der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren oder auch die Anregung der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen bieten (Faust et al. 2021; Furlanetti et al. 2015).

1.3.2 c-FOS – NEURONALE AKTIVITÄT UND SYNAPTISCHE PLASTIZITÄT

Gerade in Bezug auf die Anregung von Nervenzellen durch THS stellt sich die Frage, wie man diese Anregung nachweisen kann. Ein etablierter Marker für neuronale Aktivität und synaptische Plastizität, der auch elektrisch beeinflusst werden kann, ist das Protein c-Fos (Velazquez et al. 2015; Shehab et al. 2014). Es wurde von Curran et al. 1982 entdeckt (Curran et al. 1982). Codiert wird das c-Fos-Protein durch das *Immediate early gen c-fos* (Schulte et al. 2006). Zusammen mit dem Protein c-Jun bildet c-Fos ein Dimer das Teil des Transkriptionsfaktors Aktivator-Protein-1 (AP-1) ist (Shaulian et al. 2001). Als Teil von AP-1 ist c-Fos eng in die Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose eingebunden und nimmt zudem Einfluss auf die Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel Mikroglia (Colotta et al. 1992; Cruz-Mendoza et al. 2022; Shaulian et al. 2001; Sheng et al. 1990).

Die *c-fos*-Expression und die c-Fos-Synthese können durch verschiedene Stimuli wie zum Beispiel Krampfanfälle, Hypoxie, Amphetamine oder Aktivierung des Langzeitgedächtnisses induziert werden (Barros et al. 2015; Couceyro et al. 1994; Gallo et al. 2018; Gass et al. 1992; Umino et al. 1995). Auch nach elektrischer Stimulation erhöht sich die Dichte von

c-Fos⁺ Zellen in Hirnregionen wie dem *Thalamus*, dem STN sowie im motorischen *Cortex*, den Basalganglien oder auch dem *Hippocampus* (Schulte et al. 2006; da Silva et al. 2014). In den stimulierten Kerngebieten korreliert die Dichte c-Fos⁺ Zellen mit der neuronalen Aktivität (da Silva et al. 2014). In Analysen des Expressionsmusters und der Refraktionszeit von c-Fos wurde festgestellt, dass die Zahl c-Fos⁺ Zellen eine Stunde nach Stimulationsbeginn ihr Maximum erreicht und in der Regel drei bis sechs Stunden nach Beginn der Stimulation wieder auf ein basales Niveau zurückkehrt (Barros et al. 2015; Wessel et al. 1991). Änderungen der Dichte von c-Fos⁺ Zellen sind aber auch noch Stunden bis Tage nach dem *Stimulus* möglich (Morgan et al. 1987; Zheng et al. 2014). Im Rattengehirn fokussiert sich c-Fos unmittelbar auf den Zellkern und zeigt in diesem Bereich ein eher heterogenes Anlagerungsmuster. In Nervenfasern und Dendriten kommt c-Fos kaum vor, da es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt (Dragunow et al. 1988). Eine gestörte *c-fos*-Expression wird mit neuronaler Dysfunktion sowie Gedächtnis- und Lerndefiziten in Verbindung gebracht (Gallo et al. 2018).

1.3.3 C-FOS UND DIE TIEFE HIRNSTIMULATION

Nicht nur kurzzeitige Auswirkungen der THS, auch Auswirkungen der längerfristigen Stimulation auf die Dichte c-Fos⁺ Zellen wurden bereits untersucht (Pflüger et al. 2019). In der Studie von Pflüger et al. wurden die Auswirkungen einer sechstägigen THS des dorsolateralen *Striatum* im Rattengehirn auf die Anzahl c-Fos⁺ Zellen im Vergleich zu einer dreistündigen Stimulation geprüft. Hierbei konnte weder nach dreistündiger noch nach sechstägiger Stimulation ein Unterschied in der Dichte c-Fos⁺ Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden. Limitationen der Studie sind die geringe Zahl an Versuchstieren in den Versuchsgruppen von drei bis fünf Tieren sowie die Platzierung der Elektrode im *Striatum*, da andere Kerngebiete der Basalganglien sowie Teile des *Cortex* im THS-Downstream erfasst werden. Im Gegensatz zu Pflüger et al. konnten Schulte et al. einen klaren Anstieg in der Zahl c-Fos⁺ Zellen nach zwei- und vierstündiger THS des STN im Rattengehirn bestimmen (Schulte et al. 2006). Zudem zeigte sich auch in primären und sekundären Projektionsgebieten des STN wie der SN, dem GP und dem motorischen *Cortex* eine erhöhte Dichte c-Fos⁺ Zellen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch durch Shehab et al. in der Ratte dargelegt werden. Nach einer Stimulationszeit des STN von 20 oder 90 Minuten zeigte sich sowohl im STN als auch in primären und sekundären Projektionsgebieten des STN wie der SN und dem GP eine erhöhte Dichte c-Fos⁺ Zellen (Shehab et al. 2014).

Auch im 6-OHDA-Modell des IPS wurde eine erhöhte Dichte c-Fos⁺ Zellen bereits nach vierstündiger THS nachgewiesen (Saryyeva et al. 2011). Saryyeva et al. analysierten den *Thalamus*, den *Nucleus pedunculo pontinus tegmentalis* (PPTg) sowie den motorischen *Cortex*

und den *Hippocampus* nach PPTg-THS. Eine erhöhte Zahl c-Fos⁺ Zellen konnte im unmittelbar stimulierten Kerngebiet, dem PPTg, festgestellt werden. In den anderen untersuchten Kerngebieten zeigte sich keine Veränderung in der Anzahl c-Fos⁺ Zellen nach vierstündiger THS des PPTg. Insgesamt scheint somit auch für die Beeinflussung von c-Fos in primären oder sekundären Projektionsgebieten das Gleiche zu gelten wie für die Beeinflussung der nicht-motorischen Symptome in der Studie von Fauser et al. – das Stimulationstarget ist entscheidend für die Wirkung der THS (Fauser et al. 2021).

Die vorangegangenen Arbeiten haben sich bereits intensiv mit c-Fos als Marker für neuronale Aktivität und Plastizität im Rahmen der THS auseinandergesetzt. Jedoch ist bis jetzt noch nicht untersucht worden, ob es nach einer langfristigen STN-THS im 6-OHDA-Modell zu einer Änderung in der Dichte c-Fos⁺ Zellen kommen kann (Schulte et al. 2006; Shehab et al. 2014). Eine solche Analyse ist allerdings essentiell, um herauszufinden, ob c-Fos auch als Marker neuronaler Plastizität in Tiermodellen des IPS mit langfristiger STN-THS dienen und somit wichtige Informationen zu THS-Effekten mit langer Latenz liefern kann. Auch eine Betrachtung der TH als zentrales Enzym der Dopaminsynthese und zentraler Teil der IPS-Pathologie könnte hierbei von Bedeutung sein.

1.4 ZIEL DER PROMOTIONSARBEIT

Ziel dieser Arbeit ist es zeitlich latente Effekte einer Tiefen Hirnstimulation (THS) des *Nucleus subthalamicus* (STN) auf das dopaminerge System in einem Modell des idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS) darzustellen. Insbesondere sollen zeitlich latente Effekte der THS auf die neuronale Plastizität untersucht werden. Hierfür erfolgte zunächst eine siebentägige, unilaterale Stimulation des STN im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell (6-OHDA-Modell) der Ratte. Im Anschluss wurden dopaminerge Zellpopulationen in repräsentativen Kerngebieten des motorischen und limbischen Systems untersucht.

Im Rahmen der Erforschung der THS spielt die Beeinflussung der neuronalen Plastizität eine zentrale Rolle, um therapeutische THS-Effekte mit langer Latenz bis zum Wirkungseintritt richtig einzuordnen. In der Vergangenheit haben sich mehrere Studiengruppen mit der Beeinflussung der neuronalen Plastizität durch die THS befasst (Pflüger et al. 2019; Saryyeva et al. 2011; Schulte et al. 2006). Der wesentliche Schritt, die THS langfristig in einem pathophysiologischen Tiermodell des IPS zu implementieren, wurde jedoch nur durch Fauser et al. durchgeführt (Fauser et al. 2021). Denn nur durch eine langfristige Beeinflussung der neuronalen Aktivität ist es möglich, THS-Effekte mit langer Latenz zu untersuchen. Dies gilt vor allem für die Beeinflussung der neuronalen Plastizität. Eine minimale Stimulationsdauer von mehreren Tagen, wie sie in dieser Arbeit angewendet wurde, ist somit essentiell. Denn das Ziel der Arbeit ist es nicht, die kurzfristigen Effekte der THS zu analysieren, sondern Effekte mit langer Latenz zu untersuchen.

Neben der richtigen Stimulationsdauer spielt auch das richtige Stimulationstarget eine wesentliche Rolle. Denn das Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss der THS auf das neuronale Netzwerk im 6-OHDA-Modell des IPS zu prüfen und nicht die unmittelbare elektrische Beeinflussung einzelner Neurone in der Elektrodenumgebung zu betrachten. Es wurde hierfür der STN als Stimulationstarget verwendet, denn nur nach STN-THS wurde bis jetzt ein Einfluss auf die neuronale Plastizität nachgewiesen (Fauser et al. 2021; Shehab et al. 2014).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit mit dem Transkriptionsfaktor c-Fos ein Marker für Zellaktivität verwendet, der in viele Prozesse der neuronalen Plastizität, wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose, eingebunden ist. Das Ziel ist es, mit c-Fos einen funktionellen Biomarker in einem Tiermodell mit langfristiger Stimulation zu untersuchen, der die Plastizität eines neuronalen Netzwerks möglichst multimodal widerspiegelt (Sheng et al. 1990; Shaulian et al. 2001; Colotta et al. 1992; Cruz-Mendoza et al. 2022).

In dieser Arbeit wurde das etablierte 6-OHDA-Modell der Ratte mit einer einseitigen Läsion des medialen Vorderhirnbündels (MVB) verwendet, um die Auswirkungen der STN-THS auf ein fortgeschrittenes Modell des IPS und somit auf ein deutlich beeinträchtigt neuronales Netzwerk zu untersuchen. Betrachtet wurden hierfür die Kerngebiete *Substantia nigra pars compacta* (SNpc), *Substantia nigra pars reticulata* (SNpr) und *Area tegmentalis ventralis* (VTA). Diese dopaminergen Kerngebiete haben einen zentralen Stellenwert in der Pathophysiologie des IPS und sind sowohl Teil des motorischen als auch des limbischen Systems (Healy-Stoffel et al. 2014; Caligiore et al. 2016).

Insgesamt baut diese Arbeit auf den Ergebnissen vorangegangenen Studien auf und vereint hierbei das pathophysiologische Tiermodell mit einem langfristigen klinischen Therapieansatz. Es werden so zeitlich latente Effekte einer STN-THS auf das dopaminerge System in einem Modell des IPS untersucht.

II. MATERIAL UND METHODIK

Alle im folgenden Kapitel aufgeführten Geräte, Materialien, Lösungsmittel und Antikörper sind mit Handelsnamen und Herstellervermerk im Fließtext genannt. Entsprechende Bestellnummern und Herstelleradressen der einzelnen Artikel sind zusammenfassend im Kapitel 7.2 aufgeführt. Alle Versuchsmethoden wurden durch die verantwortlichen Behörden (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei, Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland, Aktenzeichen 7221.3-1.1-051/17) genehmigt und im Rahmen der ARRIVE Richtlinien sowie den EU-Vorgaben 2010/63/EU zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt. Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten operativen Eingriffe (Läsion, Elektrodenimplantation, Stimulation und Perfusion) wurden durch Dr. Kathrin Badstübner-Meeske, Dr. Mareike Fauser und Maria Kober durchgeführt. Die Verfasserin dieser Arbeit hat hierbei assistiert. Alle weiteren im Kapitel Material und Methodik beschriebenen Arbeitsschritte wurden selbstständig durch die Verfasserin dieser Arbeit durchgeführt.

2.1 TIERE, LÄSION UND GRUPPENEINTEILUNG

2.1.1 TIERE UND TIERHALTUNG

In dieser Arbeit wurden männliche Wistar/Wistar-Han Ratten (265-360 g; erworben bei Charles River Laboratories, Deutschland) verwendet. Die Versuchstiere wurden in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus unter kontrollierten, klimatisierten Bedingungen (ca. 21 °C und 40-60 Prozent Raumfeuchte) gehalten. Die Ratten erhielten ein Alleinfuttermittel in Pelletform (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Trinkwasser in Überkopfflaschen war jederzeit für die Versuchstiere frei zugänglich. Die Einstreu (Bedding Abedd (10 kg) Espe Maxi 3-5 mm, Abedd, Lettland) wurde mindestens einmal pro Woche gewechselt. Alle Ratten wurden zwei Mal wöchentlich gewogen. Zum Schutz vor Beschädigung des Stimulators durch andere Tiere wurden die Tiere nach der Elektrodenimplantation einzeln gehalten.

2.1.2 6-OHDA-INJEKTION

Alle verwendeten Versuchstiere wurden einer unilateralen Läsion mit 6-OHDA unterzogen. Die Injektion erfolgte in MVB der rechten Hemisphäre des Rattengehirns. Wie bereits in vorangegangenen wissenschaftlichen Arbeiten durch Badstübner et al. oder auch Yuan et al.

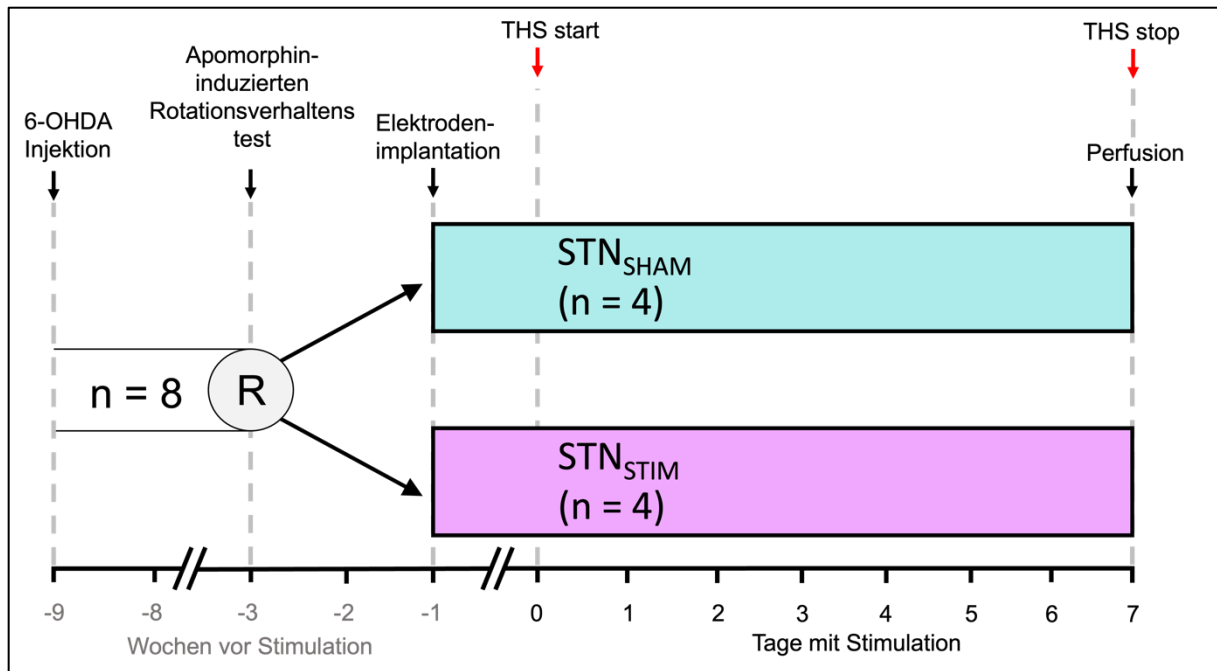


Abbildung 6: Studiendesign. Insgesamt wurden acht 6-OHDA läionierte Tiere nach erfolgter Läsionskontrolle in eine nicht-stimulierte Kontrollgruppe (STN_{SHAM}) und eine stimulierte Versuchsgruppe (STN_{STIM}) eingeteilt. Allen Tieren wurde acht Wochen nach Läsion eine Elektrode in den *Nucleus subthalamicus* (STN) der läionierten Hemisphäre implantiert. Bei allen Tieren der STN_{STIM}-Gruppe wurde die Tiefe Hirnstimulation (THS) eine Woche nach Elektrodenimplantation begonnen. Bis auf die Aktivierung der THS unterlagen die Tiere der STN_{SHAM}-Gruppe den gleichen Bedingungen. Nach sieben Tagen wurde die Stimulation der STN_{STIM}-Gruppe beendet und eine transkardiale Perfusion aller Versuchstiere durchgeführt. Das adaptierte Schema ist aus der Publikation „*Subthalamic nucleus deep brain stimulation induces nigrostriatal dopaminergic plasticity in a stable rat model of Parkinson's disease*“ übernommen (Helf et al. 2023). Abkürzungen: 6-OHDA – 6-Hydroxydopamin, R – Apomorphin-induzierter Rotationstest.

beschrieben, erzeugt diese Injektion einen Untergang von dopaminergen Neuronen im ventralen Mittelhirn (Badstuebner et al. 2017; Yuan et al. 2005). Die Ratten wurden vor dem operativen Eingriff mittels Isofluran (Forene, AbbVie, Deutschland; Baxter, Deutschland) und einer gewichtsadaptierten Ketamin-Xylazine-Mischung (Ketanest, Pfizer, USA; Rompun, Bayer Vital, Deutschland) anästhesiert. Die Koordinaten wurden in einem stereotaktischen Apparat (Stoelting Neuroscience, Irland) festgelegt und richteten sich nach dem Rattenatlas von Paxinos und Watson. Die 6-OHDA-Läsion wurde acht Wochen vor der Implantation der Elektrode durchgeführt (**Abbildung 6**).

2.1.3 APOMORPHIN-INDUZIERTER ROTATIONSTEST

Das Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNpc der einzelnen Versuchstiere wurde mittels Apomorphin-induziertem Rotationstest sechs Wochen nach der 6-OHDA-Injektion überprüft (Badstuebner et al. 2017). Dabei wurde Apomorphin (Apomorphin 10mg/ml, Teclapharm GmbH, Lüneburg, Deutschland) gewichtsadaptiert intraperitoneal injiziert. Bei erfolgreicher, einseitiger Läsion der SNpc induziert die Injektion von Apomorphin

asymmetrische Rotationsbewegungen des Versuchstieres um die eigene Achse. Der Dopaminagonist Apomorphin erzeugt in diesem Rotationstest auf der intakten Seite einen stärkeren Bewegungsstimulus (Metz et al. 2005). Zur Objektivierung wurden die Versuchstiere in einen Zylinder gesetzt, in dem sie Drehungen um 360° vollzogen. Die Zählung der einzelnen Rotationen wurde fünf Minuten nach der Applikation von Apomorphin begonnen und dauerte 40 Minuten. Gezählt wurden die Umdrehungen pro Minute. Bei rechtsseitiger Läsion rotierten die Versuchstiere hauptsächlich nach links, dementsprechend wurden Rechtsrotationen von der Gesamtzahl an Linksrotationen abgezogen. Als Rotation wurde eine vollständige Drehung um 360° gewertet. Die Läsion wurde als erfolgreich gewertet, wenn ein Versuchstier nach dem Abzug der Rechtsrotationen mehr als vier Linksrotationen pro Minute durchlaufen hatte. Nach den Ergebnissen des Rotationstests wurden die Tiere gleichmäßig in zwei Versuchsgruppen aufgeteilt (**Abbildung 6**). Eine Versuchsgruppe diente als Kontrollgruppe (STN_{SHAM}). Die zweite Gruppe (STN_{STIM}) war über sieben Tage einer THS des STN ausgesetzt. Bis auf die eigentliche Stimulation wurden beide Versuchsgruppen im Experiment in gleicher Weise behandelt.

2.2 ELEKTRODENIMPLANTATION, STIMULATION UND PERFUSION

2.2.1 ELEKTRODENIMPLANTATION

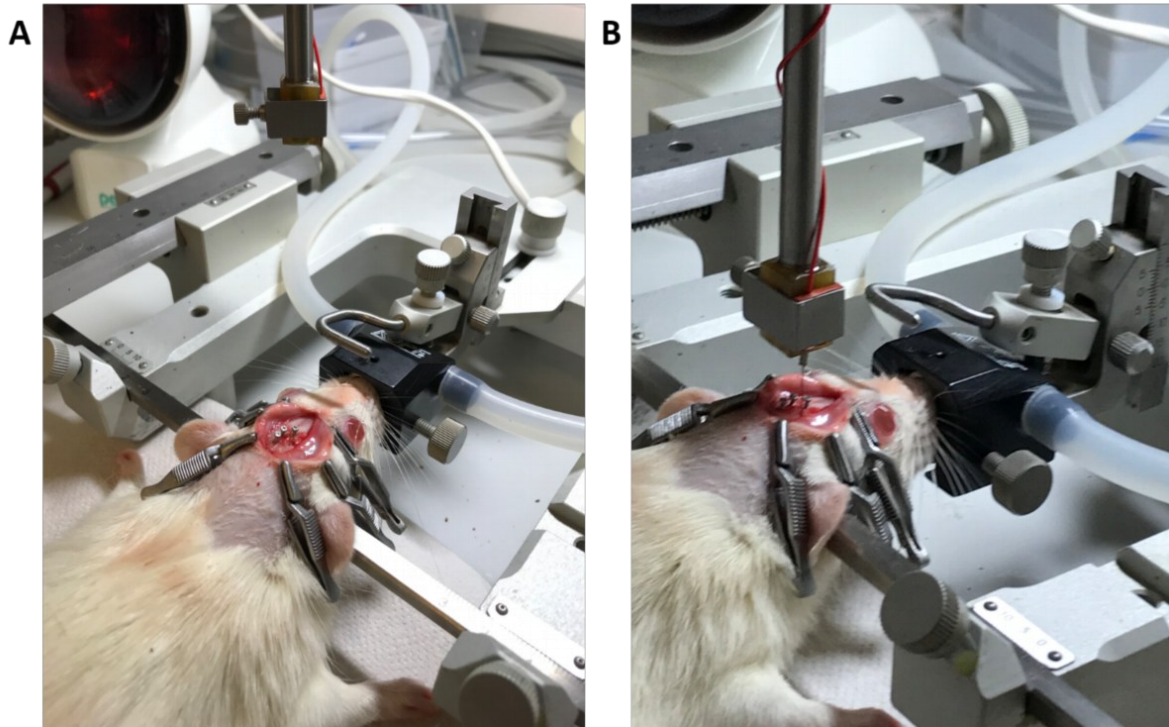


Abbildung 7: Elektrodenimplantation. Abgebildet ist ein repräsentatives Versuchstier mit freigelegter Schädelkalotte und fixierten Ankerschrauben (**A**) sowie während der Elektrodenimplantation (**B**). Das Versuchstier ist in einem stereotaktischen Apparat (Stoelting Neuroscience, Irland) fixiert, wodurch die Elektrode exakt entsprechend der stereotaktischen Koordinaten des *Nucleus subthalamicus* platziert werden kann. Das Versuchstier befindet sich während des gesamten Eingriffs in chirurgischer Narkosetiefe und wird prä-, peri- sowie postoperativ analgetisch versorgt.

Acht Wochen nach der Injektion von 6-OHDA wurde jeweils eine unipolare Platin-Iridium-Elektrode (Microprobes for Life Science, USA) in den STN der läsierten Hemisphäre implantiert. Die Koordinaten für die Platzierung der Elektrodenspitze richteten sich auch in diesem Eingriff nach dem Rattenhirnatlas von Paxinos und Watson und wurden durch einen stereotaktischen Apparat (Stoelting Neuroscience, Irland) exakt realisiert (Paxinos et al. 2006). Die implantierten Elektroden und der Stimulator wurden von Badstübner et al. entwickelt und durch die Firma Microprobes for Life Science hergestellt (Badstuebner et al. 2017). Auch in diesem Fall wurden die Ratten mittels Isofluran (Forene, AbbVie, Deutschland; Baxter, Deutschland) und einer gewichtsadaptierten Ketamin-Xylazine-Mischung (Ketanest, Pfizer, USA; Rompun, Bayer Vital, Deutschland) in chirurgischer Narkosetiefe anästhesiert. Nach Freilegung der Schädelkalotte wurden drei Ankerschrauben zur späteren Fixierung der Elektrode in der Kalotte befestigt (**Abbildung 7A**). Danach wurde der Schädelknochen in unmittelbarer Nähe durchbohrt, um die Dura mater freizulegen. Diese wurde dann vorsichtig

mit einer Lanzette durchschnitten. Die im stereotaktischen Apparat fixierte Elektrode (**Abbildung 7B**) wurde anschließend vorsichtig bis zu den vorher festgelegten Koordinaten des STN eingeführt und anschließend an der Kalotte fixiert. Nach der Implantation wurden die isolierten Stimulationskabel um die Ankerschrauben geschlungen und mit einem lichthärtenden Haftmittel (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein) ebenfalls an der Schädelkalotte fixiert. Aponeurose und Kopfhaut wurden im Anschluss mittels Einzelknopfnähten wieder verschlossen. Um einen intraoperativen Wärmeverlust des Versuchstieres zu vermeiden, wurden mit warmem Wasser gefüllte Handschuhe in unmittelbarer Nähe des Rattenkörpers platziert und während des Eingriffs mehrfach ausgetauscht. Um das Austrocknen der Kornea zu vermeiden, wurde ein Augen-Gel angewendet (Vidisic, Dr. Mann Pharma GmbH, Deutschland). Postoperativ wurden die Versuchstiere mit Metamizol analgesiert. Des Weiteren wurden die Ratten unmittelbar nach den Operationen mit abgedeckten Köpfen in einer ruhigen Umgebung unter einer Rotlichtlampe platziert, um das Auskühlen des Rattenkörpers zu verhindern. Die Ratten standen in diesem Setting unter Überwachung bis Körperfunktionen wie Entleerung der Blase, Augenzwinkern und Bewegung einzelner Gliedmaßen wieder möglich waren.

2.2.2 STIMULATIONSEINSTELLUNGEN UND KONTROLLE

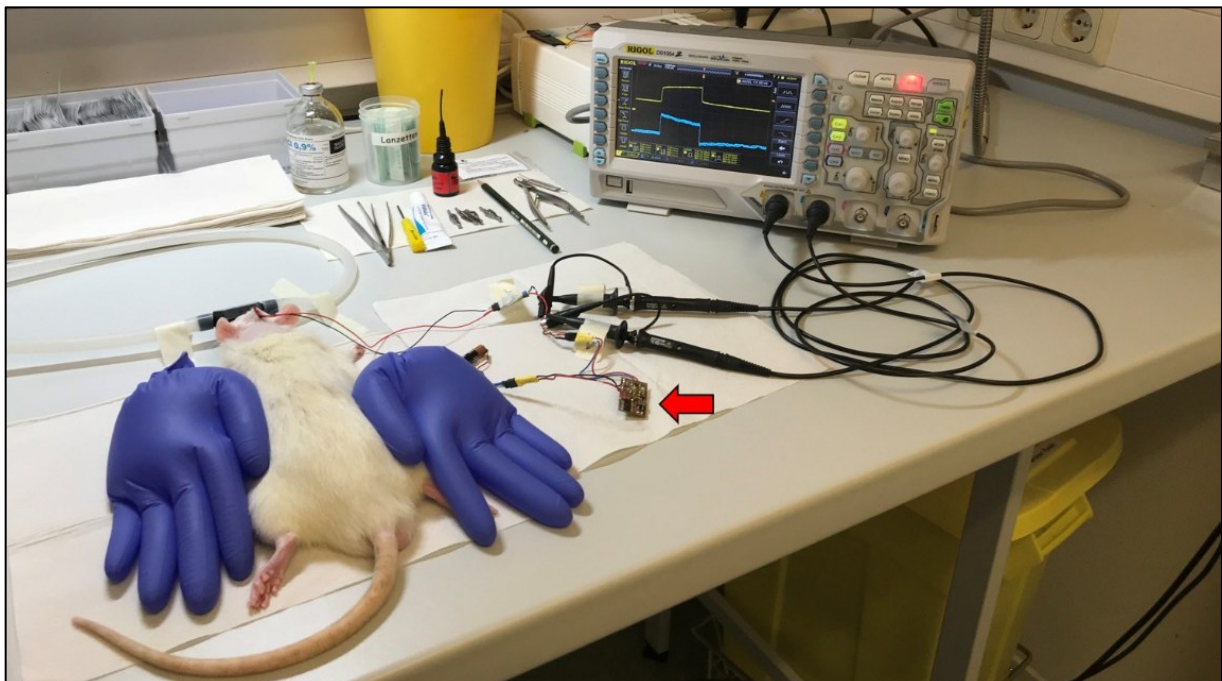


Abbildung 8: Setting zur Kontrolle von Elektrode und Stimulator. Unter kurzzeitiger Narkose des Tieres wurden Elektrode und Stimulator (roter Pfeil) temporär an ein Oszilloskop (Rigol DS 1054, UltraVision, Großbritannien) angeschlossen. Anhand dessen wurden Funktionsfähigkeit sowie die Stimulationsparameter kontrolliert.

Eine Woche nach der Elektrodenimplantation wurden Stimulator und Batterie mittels Rucksacks am Versuchstier befestigt. Verwendet wurde ein in der Arbeit von Badstübner et al. entwickeltes Stimulator-System (Badstuebner et al. 2017). Anschließend erfolgte die Stimulation der STN_{STIM}-Gruppe für sieben Tage mit folgenden Parametern: Frequenz 130 Herz, Impulsdauer 60 Mikrosekunden (μ s), Stromstärke 200 Mikroampere (μ A), Spannung 1,25 Volt. Die Funktionsfähigkeit von Elektrode und Stimulator wurde dabei regelmäßig mit Hilfe eines Oszilloskops (Rigol DS 1054, UltraVision, Großbritannien) kontrolliert (**Abbildung 8**). Die STN_{SHAM}-Gruppe wurde nicht stimuliert und trug jedoch einen in Form und Gewicht identischen Dummy-Stimulator im Rucksack.

2.2.3 PERFUSION, KONSERVIERUNG UND LAGERUNG

Unmittelbar nach dem Ende der siebentägigen Stimulation wurden die Versuchstiere mit 10mg/kg Ketamin/Xylazin (Ketanest, Pfizer, USA; Rompun, Bayer Vital, Deutschland) anästhesiert. Anschließend erfolgte eine transkardiale Perfusion mit vier Prozent Paraformaldehydlösung (PFA, Morphisto, Deutschland) über 16 Minuten mit einer Flussrate von 20 ml/min zur Konservierung der Rattenkörper. Nach erfolgter Perfusion wurden die Rattengehirne aus dem Schädel entnommen und über 24 Stunden in vier Prozent Paraformaldehydlösung (PFA, Morphisto, Deutschland) gelagert. Anschließend wurden die Gehirne für mindestens 24 Stunden in einer 30-prozentigen Saccharoselösung (Carl Roth, Deutschland) entwässert und bei ca. -65 °C schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Rattengehirne bei -80 °C gelagert.

2.3 IMMUNHISTOCHEMIE UND MIKROSKOPIE

2.3.1 HIRNREGIONEN

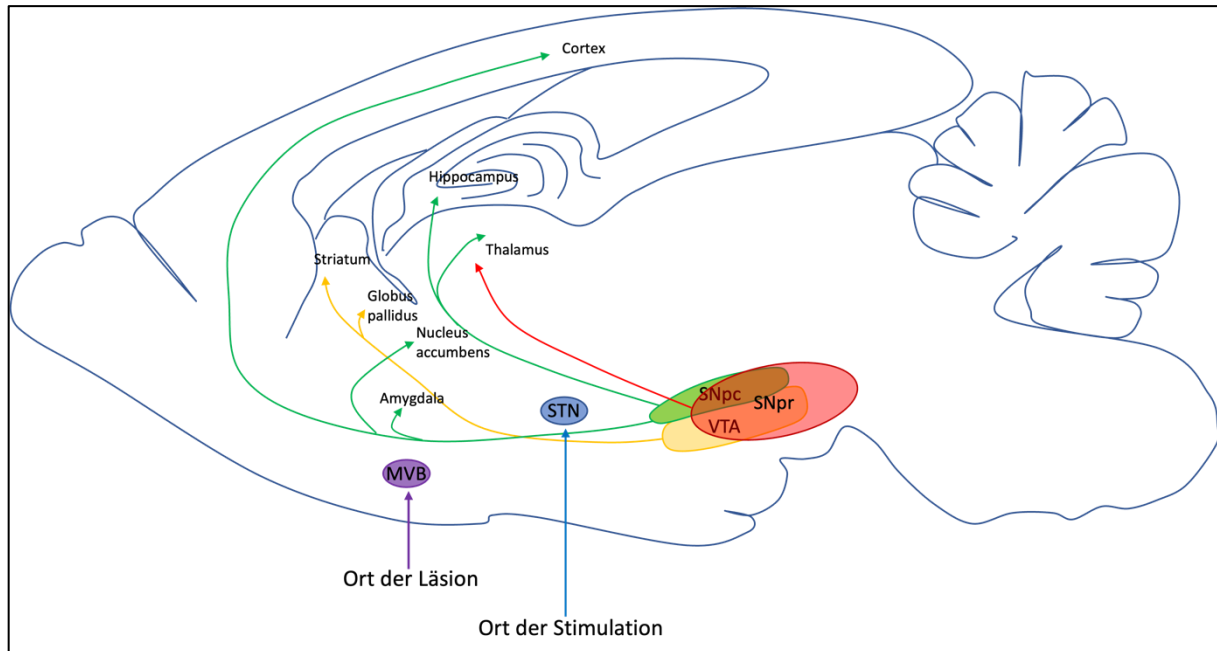


Abbildung 9: Wesentliche Hirnregionen des Experiments. Das schematisch dargestellte Rattenhirn enthält wesentliche topografische Punkte des Experiments. Dargestellt werden die Kerngebiete *Substantia nigra pars compacta* (SNpc), *Substantia nigra pars reticulata* (SNpr) und *Area tegmentalis ventralis* (VTA) sowie deren Projektionen. Zusätzlich dargestellt sind das mediale Vorderhirnbündel (MVB) als Ort der Läsion und der *Nucleus subthalamicus* (STN) als Ort der Stimulation. Adaptiert nach A. Dahlström und K. Fuxe „*Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system*“ (Dahlstroem et al. 1964).

In dieser Arbeit wurden die Kerngebiete *Substantia nigra pars compacta* (SNpc), *Substantia nigra pars reticulata* (SNpr) und *Area tegmentalis ventralis* (VTA) untersucht. Im Gegensatz zur VTA und SNpc, die hauptsächlich aus dopaminergen Zellen bestehen, besitzt die SNpr größtenteils GABAerge Zellen. Jedoch weist die SNpr eine enge topografische Verbindung zur SNpc und zahlreiche dopaminerge Efferenzen aus der SNpc auf (**Abbildung 9**). Alle im Experiment betrachteten Kerngebiete sind wie bereits in der Einleitung beschrieben von hoher Relevanz für motorische und nicht-motorische Symptome des IPS (Caligiore et al. 2016; Oades et al. 1987).

2.3.2 GEFRIERSCHNITTE

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde in dieser Arbeit ein Kryostat (CM3050 S, Leica, Deutschland) verwendet. Das Prinzip der Gefrierschnittanfertigung beruht auf einem Rotationsmikrotom, in dem sich der zu schneidende Gewebsblock auf das feststehende Mes-

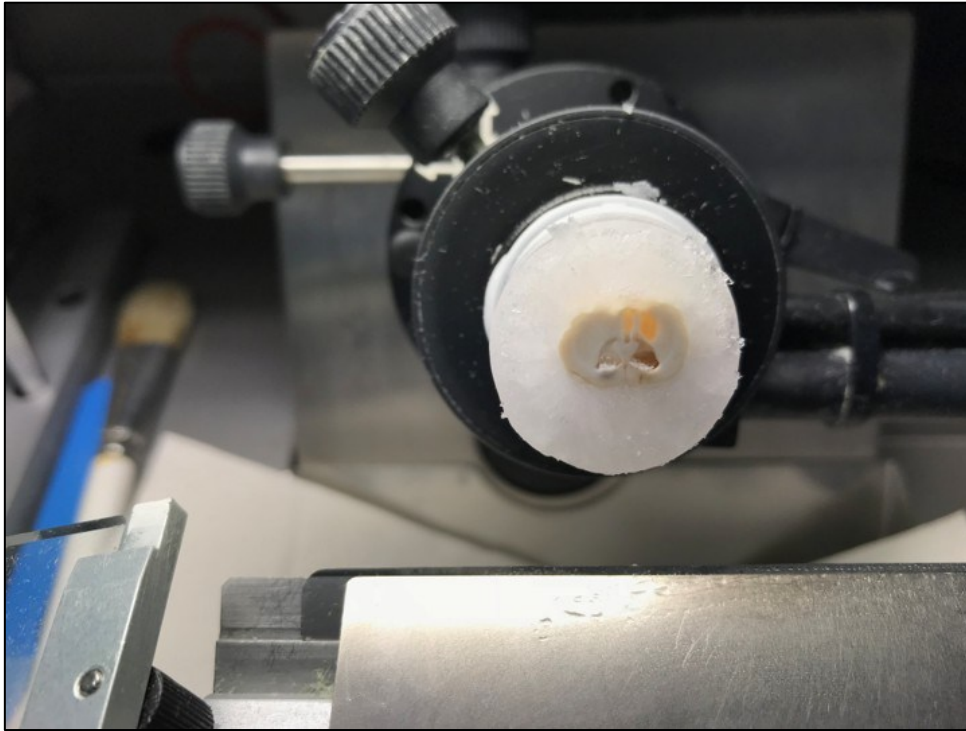


Abbildung 10: Anfertigung von Gehirnschnitten im Kryomikrotom. Abgebildet ist ein in TissueTek/PBS eingebettetes Rattengehirn, welches im Objekthalter eingespannt ist. Durch Bewegen des Objekthalters gegen die Kryomikrotomklinge, zu sehen im unteren Bild Drittel, können Serien von ultradünnen (30-40 μm) Gewebeschnitten angefertigt werden. Abkürzung: PBS – Phosphat-gepufferter Salzlösung.

ser zubewegt. Zum Zeitpunkt der Schnittgewinnung sollte die Temperatur in der Kryostatenkammer bei ungefähr $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ liegen. Zum Anfertigen der Gefrierschnitte wurden die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Rattengehirne zwei Stunden vor Schnittbeginn aus dem Kühlschrank entnommen und in einem Einbettungsmedium aus TissueTek (Sakura Fine Tek, Niederlande) und Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, Thermo Fisher Scientific, USA) im Mikrotom fixiert (**Abbildung 10**). Am vorderen Rand des Gefriertisches wurde eine zuvor gekühlte Rasierklinge eingespannt. Die Schnittstärke wurde auf $30\text{ }\mu\text{m}$ justiert und die Gehirne von rostral nach caudal geschnitten. Die einzelnen Schnitte wurden mittels in PBS getränktem Pinsel in 12-Well-Mikrotiterplatten (Cellstar, Greiner Bio-One, Österreich) gefüllt mit Kryoprotektionslösung (30-prozentigen Ethylenglycol, 25-prozentigen Glycerin in PBS) überführt. Während der Schnittgewinnung wurden die einzelnen Kerngebiete in Anlehnung an den Rattenatlas von Paxinos und Watson in Wellplatten einsortiert und markiert (Paxinos et al. 2006). Diese Markierung diente als Orientierung für die spätere immunhistochemische Färbung. Die Koordinaten der Hirnregionen wurden in Bezug auf das *Bregma* angegeben. Das *Bregma* ist der Schnittpunkt von *Sutura sagittalis* und *Sutura coronalis*. Die Koordinaten lagen für die SNpc zwischen *Bregma* $-6,60\text{ mm}$ und *Bregma* $-4,56\text{ mm}$, für die SNpr zwischen *Bregma* $-6,72\text{ mm}$ und *Bregma* $-4,36\text{ mm}$ und für die VTA zwischen *Bregma* $-6,84\text{ mm}$ und $-4,56\text{ mm}$. Die Lagerung der Schnitte erfolgte anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verarbeitung.

2.3.3 INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG UND ZELLPOPULATIONEN

Zur weiterführenden Bestimmung verschiedener Zellpopulationen wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein primärer Antikörper eingesetzt, der gegen spezielle Zellproteine (Antigene) gerichtet ist. Anschließend wird ein fluorochromierter, sekundärer Antikörper zur Signalverstärkung angewendet, welcher gegen den Primäantikörper gerichtet ist. Angewendet wurden in dieser Arbeit primäre Antikörper gegen das Neuronale Nuclei Antigen (NeuN), TH und c-Fos. NeuN ist ein DNA-bindendes Protein, das ausschließlich in den Zellkernen und Perikaryen von Neuronen vorkommt (Gusel'nikova et al. 2015). Die TH wird als Marker für dopaminerge Neurone eingesetzt und kommt ubiquitär im Zytoplasma von Nervenzellen vor, die einen der drei Botenstoffe Adrenalin, Noradrenalin oder Dopamin synthetisieren (Calvo et al. 2011). Das Protein c-Fos wird von Zellen nach elektrischer Stimulation vermehrt synthetisiert und ist ein Marker für erhöhte Zellaktivität (Schulte et al. 2006; da Silva et al. 2014). Als Teil eines Transkriptionsfaktors interagiert es mit der DNA und ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde zusätzlich eine 4'6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Kernfärbung eingesetzt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher mit DNA interkaliert und somit alle kernhaltigen Zellen anfärbt.

2.3.4 ETABLIERUNG DER C-FOS-FÄRBUNG

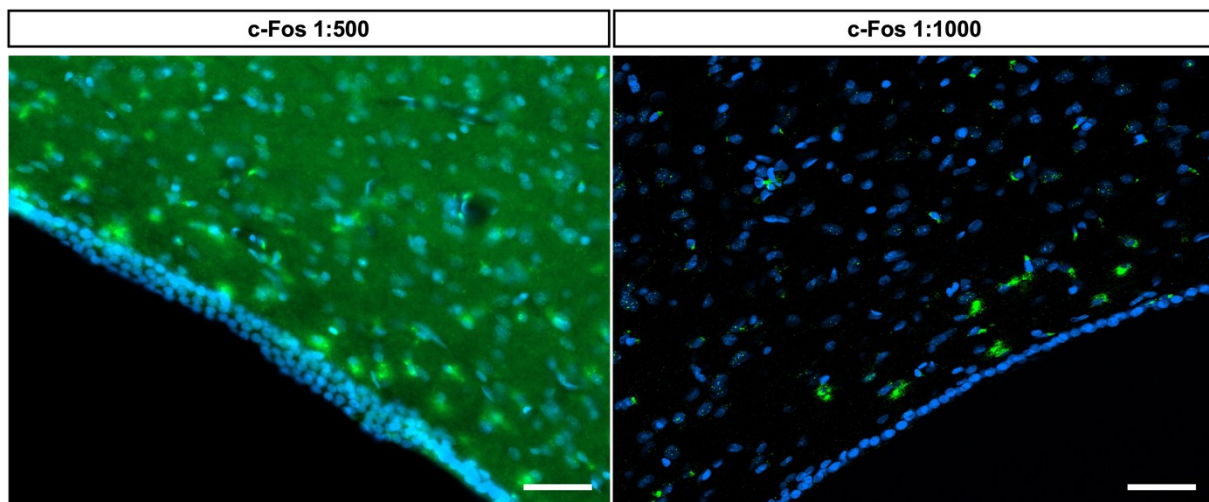


Abbildung 11: Kontrolle der immunhistochemischen Färbung von c-Fos. Dargestellt werden DAPI⁺ und c-Fos⁺ Zellen in 20-facher Vergrößerung im Bereich des Ventrikels. Die c-Fos Antikörperkonzentration liegt links bei 1:500 und rechts bei 1:1000. Im rechten Bild sind die Zellen klarer c-Fos positiv, da sie nicht von Hintergrundrauschen überlagert werden. Beide Bilder enthalten einen weißen Maßstabalken (50 µm). *Abkürzung: DAPI – Diamidin-2-phenylindol.*

Vor der eigentlichen Färbung wurde zunächst die Verdünnung des c-Fos Antikörpers in Testfärbungen optimiert. Als Referenzregion wurde die Ventrikelregion im Rattengehirn betrachtet. Es wurde in einer Konzentration von 1:500 und 1:1000 gefärbt. Aufgrund des geringeren Hintergrundrauschens von c-Fos bei 1:1000 wurde diese Konzentration verwendet (**Abbildung 11**).

2.3.5 ABLAUF DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG

Das detaillierte Färbeprotokoll ist im Kapitel 7.3.1 aufgeführt. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit des Fließtextes sind die Hersteller der primären und sekundären Antikörper erst in der Materialliste des Kapitels 7.2.4 aufgeführt.

Zunächst wurden die einzelnen Schnitte aus der PBS-Lösung (Thermo Fisher Scientific, USA) in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween20 (TBST) überführt und gewaschen. Um die Zellen permeabler für die einzelnen Antikörper zu machen, folgte eine Inkubation mit Citrat Puffer (Carl Roth, Deutschland) bei 95 °C. Nach einem anschließenden Waschdurchgang mit TBST und *Aqua destillata* wurden die Schnitte für 30 Minuten in einer Blocklösung mit Donkey-Serum (Jackson ImmunoResearch, Großbritannien) gelegt, um eine unspezifische Bindung der primären Antikörper zu verhindern. Danach folgte eine Antikörperinkubation mit den Primärantikörpern in TBST (*anti-chicken NeuN* 1:1000, *anti-rabbit c-Fos* 1:1000, *anti-mouse TH* 1:1000) über Nacht bei 4 °C. Die Schnitte wurden hierbei stetig durch einen Schüttler (Unimax 1010, Heidolph, Deutschland) bewegt.

Alle Färbeschritte des zweiten Tags wurden in einer abgedunkelten Umgebung durchgeführt, da nun immunfluoreszierende Antikörper angewendet wurden. Nach erneutem Waschen mit TBST wurde eine zweite Antikörperinkubation mit in TBST verdünnten, sekundären, fluoreszierenden Antikörpern über eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Als sekundäre Antikörper dienten *donkey anti-chicken Cy3*, *donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488* und *donkey anti-mouse Alexa Fluor 647*. Zuletzt folgte über drei Minuten die DAPI-Kernfärbung ebenfalls bei Raumtemperatur.

Im Anschluss an die Färbung wurden die einzelnen Schnitte direkt auf Objektträger (Thermo Fisher Scientific, USA) gezogen und mit auf 37 °C vorgewärmten ProLong Diamond (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) eingedeckelt. Die Schnitte wurden nach dem Eindeckeln für einen Tag ausgehärtet und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.6 NACHTRÄGLICHE FÄRBUNG ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MIKROGLIA

Im Verlauf der Arbeit stellte sich die Notwendigkeit heraus, Mikroglia sicher identifizieren zu können. Dies war zu Beginn der Arbeit nicht vorhersehbar. Aus diesem Grund ist die Färbung nachträglich an einem Tier der STN_{STIM}- und STN_{SHAM}-Gruppe durchgeführt worden (STN_{SHAM}-Gruppe: Tier 302; STN_{STIM}-Gruppe: Tier 219). In dieser separaten indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurde ein primärer Antikörper gegen ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül-1 (Iba-1) verwendet. Iba-1 ist ein gängiger Marker für Mikroglia und Makrophagen (Cruz-Mendoza et al. 2022; Mendes-Pinheiro et al. 2021). Astrozyten und Oligoglia werden durch Iba-1 nicht gefärbt. Das detaillierte Färbeprotokoll ist im Kapitel 7.3.2 aufgeführt. Die Hersteller der primären und sekundären Antikörper sind in der Materialliste des Kapitels 7.2.4 aufgelistet.

2.3.7 MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN

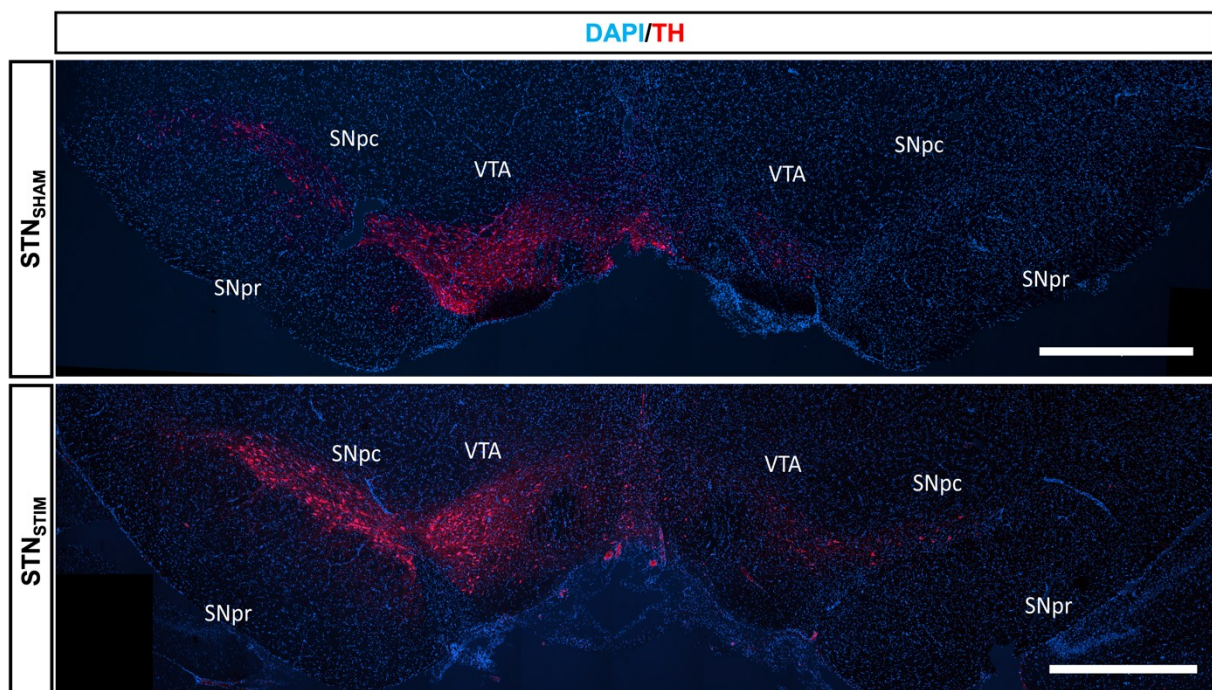


Abbildung 12: Übersichtsaufnahmen. Die Aufnahmen von Zellkernen (DAPI, blau) und dopaminergen Neuronen (TH, rot) der linken und rechten Hemisphäre zeigen deutlich die 6-OHDA induzierte, rechtsseitige Läsion in beiden Gruppen (STN_{SHAM}-Gruppe: Tier 302; STN_{STIM}-Gruppe: Tier 219). Dargestellt sind die Kerngebiete *Substantia nigra pars compacta* (SNpc), *Substantia nigra pars reticulata* (SNpr) und *Area tegmentalis ventralis* (VTA). Die Länge des Maßstabalkens entspricht 1000 μ m. Das Bild ist aus der Publikation „*Subthalamic nucleus deep brain stimulation induces nigrostriatal dopaminergic plasticity in a stable rat model of Parkinson's disease*“ übernommen (Helf et al. 2023). Abkürzungen: DAPI – Diamidin-2-phenylindol, TH – Tyrosinhydroxylase.

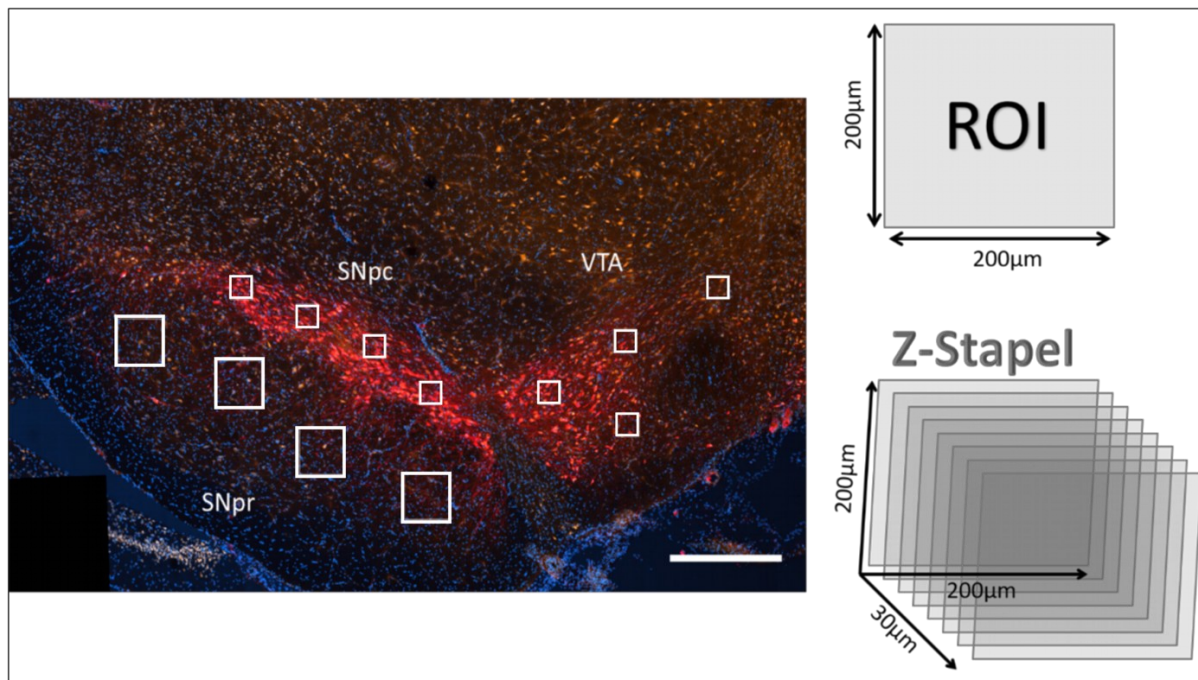


Abbildung 13: Darstellung der Analysestrategie. Die Aufnahme (links) zeigt DAPI⁺, NeuN⁺ und TH⁺ Zellen in der Substantia nigra pars compacta (SNpc), Substantia nigra pars reticulata (SNpr) sowie der Area tegmentalis ventralis (VTA) im nicht-läsionierten Mittelhirn (linke Hemisphäre) eines nicht-stimulierten Tieres. Die Regions of interest (ROIs) von 100x100 µm² (SNpc und VTA) und 200x200 µm² (SNpr) wurden zufällig innerhalb der entsprechenden Kerngebiete verteilt. Die ROIs wurden mittels strukturierter Beleuchtung (Apotome) als Z-Stapel mikroskopiert und anschließend analysiert. Gezeigt ist eine Aufnahme eines Tieres der STN_{STIM}-Gruppe (Tier 219). Der Maßstababstaken entspricht 500 µm. Abkürzungen: DAPI – Diamidin-2-phenylindol, NeuN –Neuronales Nuclei Antigen, STN – Nucleus subthalamicus, TH – Tyrosinhydroxylase.

Die Aufnahmen wurden mit einem Axio.Observer.Z1 mit Apotome.2 Fluoreszenzmikroskop mit ZEN Blue 3.1 Software (ZEISS, Deutschland), ausgestattet mit Kachel- und Positionsmodul, durchgeführt. Die genaue Topographie der einzelnen Regionen in den Aufnahmen konnte anhand der TH-Färbung für dopaminerge Zellen bestimmt werden (**Abbildung 12**). Die Aufnahmen wurden in allen Versuchstieren im Bereich *Bregma* -6,60 mm bis -4,36 mm getätigt, in dem die drei Kerngebiete vorlagen. Für die Aufnahmen wurden in den Kerngebieten jeweils vier quadratförmige *Regions of Interest* (ROIs) zufällig platziert (**Abbildung 13**). Diese ROIs hatten in der SNpc und der VTA, die Maße 100x100x30 µm³ und in der SNpr die Maße 200x200x30 µm³. Die Größe der ROIs wurde an die Ausdehnung der zu analysierenden Regionen und deren Zelldichte angepasst. In der Tiefe wurde die ROI in einen Z-Stapel von 17 Einzelaufnahmen gegliedert und mittels 20-fachem Trockenobjektiv aufgenommen (**Abbildung 13**). Jede Position wurde dabei mit vier verschiedenen Beleuchtungssettings aufgenommen (DAPI, AF488, AF555, AF647). Die einzelnen Aufnahmen konnten mit Hilfe der ZEN Blue 2.3 Software fusioniert oder separat angesehen werden. Da die 17 Einzelaufnahmen überlappend aufgenommen wurden, wurde diese Überlappung nachträglich zur Optimierung des Hintergrundrauschens und Bildverkleinerung im sogenannten *Shrinking* herausgerechnet.

2.4 QUANTIFIZIERUNG UND STATISTIK

Die einzelnen ROIs wurden mit Hilfe der ZEN Blue 3.1 Software (ZEISS, Deutschland) ausgezählt. Während des Auszählens wurde ein gesamter Z-Stapel einer ROI betrachtet um das doppelte Zählen einer Zelle zu vermeiden. Die Zählung wurde in einer codierten Excel-Tabelle festgehalten. Zunächst wurde die Gesamtzellzahl im DAPI-Kanal bestimmt. Daraufhin wurden nacheinander die anderen Kanäle hinzugeschaltet. Innerhalb eines Z-Stapels erfolgte die Zählung im gleichen Kontrast. Die Ergebnisse der einzelnen ROIs wurden dann zur weiteren Auswertung zunächst auf einen Kubikmillimeter genormt.

Zur weiteren statistischen Auswertung und grafischen Darstellung wurden die Daten in die Statistiksoftware Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., USA) übertragen. Im Anschluss erfolgte eine separate Normierung der Daten für jeden Zelltyp. Normiert wurden die absoluten Zellzahlen der läsionierten Hemisphären auf die absoluten Zellzahlen der nicht-läsionierten Hemisphären. Es folgte eine deskriptive statistische Analyse mit Bestimmung des Mittelwerts und des Standardfehlers (*standard error of mean*, SEM). Auf Normalverteilung wurde mittels Shapiro-Wilk-Test getestet und die Varianzhomogenität im Levene-Test überprüft. Lag beides vor, wurde mit einem t-Test für unabhängige Stichproben (Vergleich STN_{SHAM} und STN_{STIM}) auf Unterschiede der Mittelwerte getestet. Lag keine Normalverteilung vor bzw. zeigte sich eine inhomogene Varianz, wurde mittels t-Test mit Welch-Korrektur (*Welch's t-test*) auf Signifikanz getestet. Die statistische Signifikanz wurde auf $P \leq 0.05$ festgelegt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Daten sind aufgrund der erfolgten Normierung in Prozent angegeben.

III. ERGEBNISSE

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse des Apomorphin-induzierten Rotationsverhaltenstests vorgestellt. Anschließend werden die verschiedenen c-Fos Anlagerungsmuster gezeigt, ein unerwartetes Ergebnis dieser Arbeit. Es folgen darauf die Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse. Präsentiert werden die Unterschiede zwischen den Gruppen STN_{SHAM} und STN_{STIM} in der Zelldichte verschiedener Zelltypen. Dargestellt sind die relativen Werte, welche sich aus der Normierung der absoluten Zellzahl der läsierten Hemisphäre auf die absolute Zellzahl der nicht-läsierten Hemisphäre ergeben. Aufgrund der Übersichtlichkeit wird im Kapitel Ergebnisse das Prozentzeichen (%) verwendet.

3.1 LÄSIONSKONTROLLE: APOMORPHIN-INDUZIERTER ROTATIONSVERHALTENSTEST

Tabelle 1: Ergebnisse des Apomorphin-induzierten Rotationsverhaltenstests. Aufgeführt sind die einzelnen Rotationen jedes Tieres sowie der Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) für jede Gruppe. Die Linksrotationen wurden im Versuch von den Rechtsrotationen abgezogen (l-r).

Apomorphin-induzierter Rotationsverhaltenstest			
STN _{SHAM}		STN _{STIM}	
Tier Nr.	Drehungen (l-r) / min	Tier	Drehungen (l-r) / min
315	18,7	228	21,0
325	13,1	223	18,7
314	8,1	216	7,5
302	4,7	219	6,1
Mittelwert \pm SEM	11,15 \pm 3,05	Mittelwert \pm SEM	13,33 \pm 3,81

In einem vor der Elektrodenimplantation durchgeführten Apomorphin-induzierten Rotationsverhaltenstest zur Läsionskontrolle 6 Wochen nach der 6-OHDA-Läsion war die Anzahl der Rotationen pro Tier in beiden Gruppen normalverteilt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kohorten ($P = 0,67$), sodass eine äquivalente Läsion von dopaminergen Neuronen der SNpc in beiden Versuchsgruppen vorlag. Während des Rotationstests wurden Rechts- von Linksumdrehung abgezogen (l-r). Eine Drehung musste 360° umfassen, um gewertet zu werden. Es sind sowohl die Einzelergebnisse als auch Mittelwerte \pm SEM angegeben (**Tabelle 1**).

3.2 DIE DREI MUSTER DER C-FOS-ANLAGERUNG

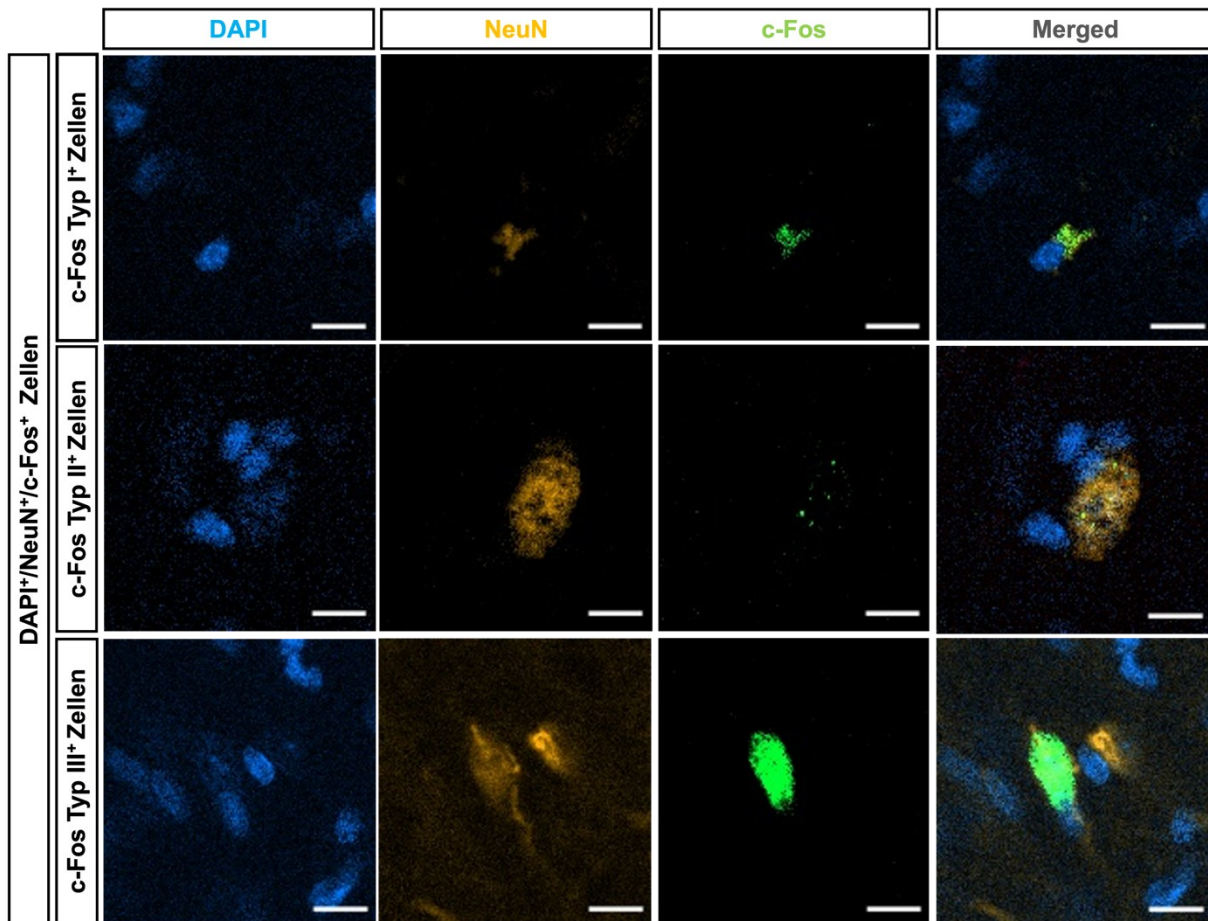


Abbildung 14: Verschiedene Anlagerungsmuster von c-Fos an den Zellkern. Abgebildet sind drei unterschiedliche Arten der c-Fos-Anlagerungen. c-Fos Typ I⁺ Zellen hatten eine randständige Anlagerung von c-Fos und NeuN. Der Zellkern dieser Zellen war 5-10 µm groß. c-Fos Typ II⁺ Zellen hatten eine eher punktförmige inhomogene Anlagerung und einen 20-25 µm großen Zellkern, der ebenfalls für NeuN⁺ war. c-Fos Typ III⁺ Zellen zeichneten sich durch eine flächige, homogene Anlagerung von c-Fos aus und hatten einen 20-25 µm großen Zellkern, der auch für NeuN positiv war. In der ersten und zweiten Zeile sind Zellen eines Tieres der STN_{STIM}-Gruppe abgebildet (Tier 216). In der dritten Zeile sind Zellen eines Versuchstieres der STN_{STIM4h}-Gruppe gezeigt (Tier 211). Die Zellen sind in 20-facher Vergrößerung dargestellt. Alle Bilder enthalten einen weißen Maßstabbalken (10 µm). *Abkürzungen: DAPI – Diamidin-2-phenylindol, NeuN – Neuronales Nuclei Antigen, STN – Nucleus subthalamicus.*

Im Laufe der quantitativen Analyse zeigten sich drei Anlagerungsformen des c-Fos-Proteins an den Zellkern. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der quantitativen Analyse in drei Zelltypen unterschieden (**Abbildung 14**). c-Fos Typ I⁺ Zellen zeigten eine kompakte, flächige Anlagerung von c-Fos im Zytoplasma in unmittelbarer Nähe des Zellkerns. Die Zellkerne dieser Zellen hatten einen ungefähren Durchmesser von 5-10 µm. c-Fos Typ II⁺ Zellen zeigten ein inhomogenes, punktförmiges Anlagerungsmuster von c-Fos in den Zellkernen. c-Fos Typ III⁺ Zellen zeigten ein homogenes, flächiges Anlagerungsmuster von c-Fos in den Zellkernen. Die Zellkerne von c-Fos Typ II⁺ und III⁺ Zellen hatten einen ungefähren Durchmesser von 20-25 µm.

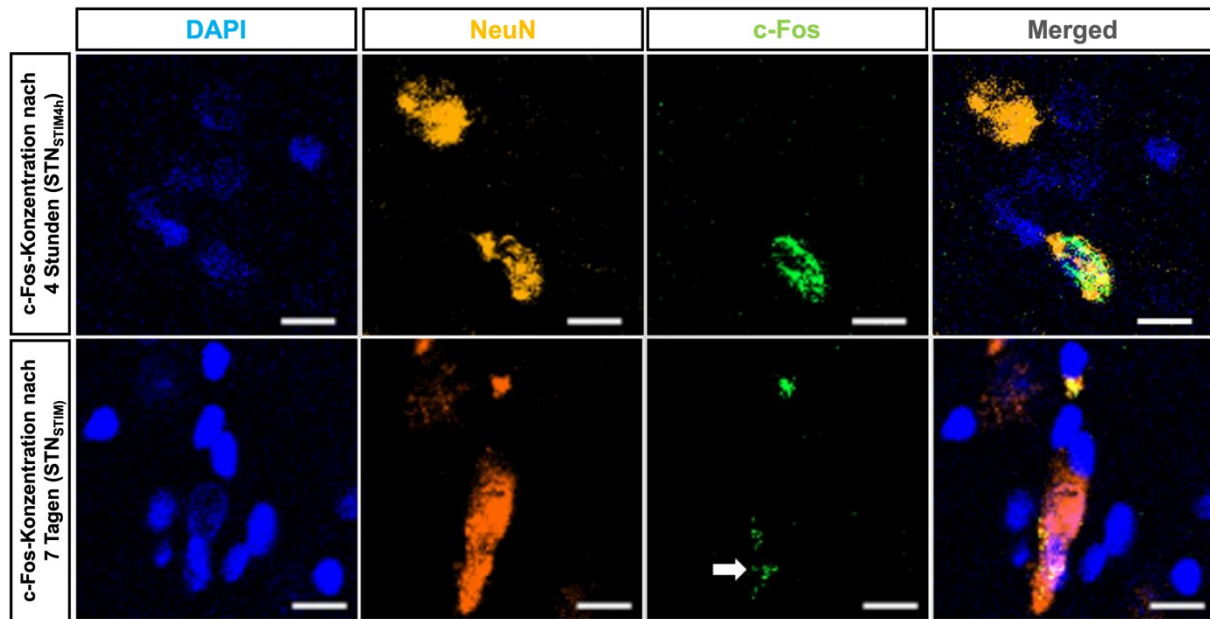


Abbildung 15: Zeitliche Dynamik der nukleären c-Fos-Konzentration. Die Immunhistochemie von c-Fos zeigt eine persistierende, basale c-Fos-Konzentration im Zellkern nach 7 Tagen kontinuierlicher STN-THS. Der weiße Pfeil markiert die basale, heterogene c-Fos-Konzentration, die sich von der flächigen c-Fos-Konzentration nach vierstündiger Stimulation unterscheidet. Die Zellen sind in 20-facher Vergrößerung dargestellt. Alle Bilder enthalten einen weißen Maßstab (10 μ m). Abgebildet sind in der ersten Zeile Zellen eines Tieres der STN_{STIM}-Gruppe (Tier 216). In der zweiten Zeile sind Zellen eines Versuchstieres der STN_{STIM4h}-Gruppe dargestellt (Tier 211). Das Bild ist in adaptierter Form aus der Publikation „Subthalamic nucleus deep brain stimulation induces nigrostriatal dopaminergic plasticity in a stable rat model of Parkinson’s disease“ übernommen (Helf et al. 2023). Abkürzungen: DAPI – Diamidin-2-phenylindol, NeuN – Neuronales Nuclei Antigen, STN – Nucleus subthalamicus, THS – Tiefe Hirnstimulation.

Der flächige c-Fos Typ III konnte in diesem Experiment in den betrachteten Kerngebieten der siebentägig stimulierten Versuchstiere nicht nachgewiesen werden. Genau dieser Typ wurde jedoch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt und ausgewertet (Saryyeva et al. 2011; Schulte et al. 2006; Shehab et al. 2014; da Silva et al. 2014). Aus diesem Grund wurden zusätzlich zwei vierstündig stimulierte Versuchstiere einbezogen (STN_{STIM4h}). Die quantitative Analyse dieser zwei Versuchstiere ist tabellarisch im Kapitel 7.1 aufgeführt. Diese Tiere sollten validieren, dass durch die elektrische Stimulation in diesem Versuchsaufbau prinzipiell auch diese Art der c-Fos-Anlagerung nachgewiesen werden kann. In dieser Auswertung zeigten sich c-Fos Typ III⁺ Zellen in allen analysierten Regionen, sodass methodische Ursachen ausgeschlossen werden konnten. Im direkten immunhistochemischen Vergleich der STN_{STIM}- und STN_{STIM4h}-Gruppe war ein deutlicher, zeitabhängiger Konzentrationsunterschied von c-Fos im Zellkern erkennbar. Die c-Fos-Konzentration nimmt mit zunehmender Stimulationsdauer ab (**Abbildung 15**).

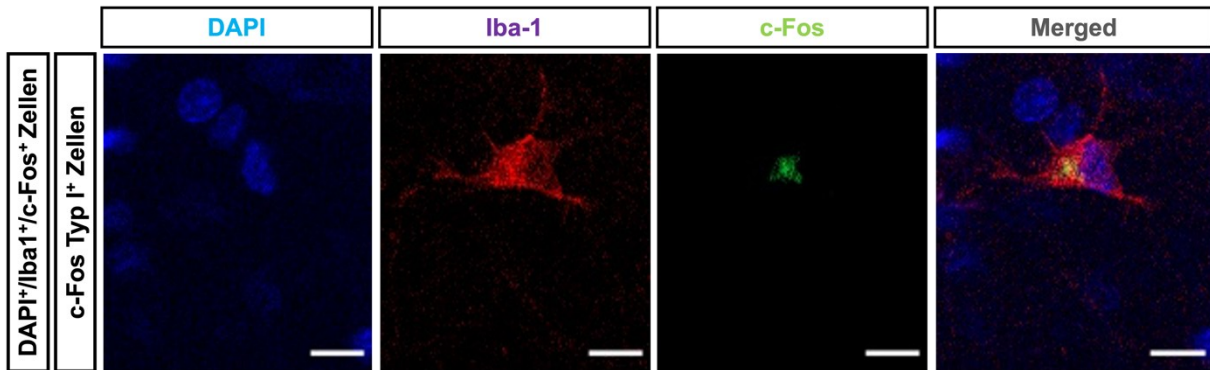


Abbildung 16: c-Fos Typ I⁺ Zellen in Kolokalisation mit dem Mikroglia marker Iba-1. Abgebildet sind c-Fos Typ I⁺ Zellen mit einer randständigen Anlagerung von c-Fos. Der Zellkern dieser Zellen war 5-10 µm groß, zusätzlich war dieser Zelltyp positiv für das ionisierte Calcium-bindende Adaptermolekül-1 (Iba-1). Iba-1 ist ein Marker für Mikroglia. Die Zellen sind in 20-facher Vergrößerung dargestellt. Alle Bilder enthalten einen 5 µm langen Maßstabbalken. Abgebildet sind Zellen eines Tieres der STN_{STIM}-Gruppe (Tier 219). *Abkürzungen: DAPI – 4'6-Diamidin-2-phenylindol, STN – Nucleus subthalamicus.*

Ein weiterer Punkt der in den Analysen auffiel war, dass sich die Zellkernmorphologie der c-Fos Typ I⁺ Zellen deutlich von den c-Fos Typ II⁺ und c-Fos Typ III⁺ Zellen unterschied. Die Zellkerne der c-Fos Typ II⁺ und c-Fos Typ III⁺ Zellen waren größer und wiesen fast immer eine Kolokalisation für NeuN auf. Aufgrund der unterschiedlichen Morphologie wurde der Verdacht gestellt, dass es sich bei c-Fos Typ I⁺ Zellen zum Beispiel um Mikroglia handeln könnte.

Eine zusätzliche separate indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen den gängigen Mikroglia-Marker Iba-1 konnte diesen Verdacht bestätigen. Die c-Fos Typ I⁺ Zellen waren auch positiv für Iba-1 (**Abbildung 16**; Cruz-Mendoza et al. 2022; Mendes-Pinheiro et al. 2021). Die Färbung ist an Tieren der STN_{STIM}- und STN_{SHAM}-Gruppe durchgeführt worden (STN_{SHAM}-Gruppe: Tier 302; STN_{STIM}-Gruppe: Tier 219). Die Mikroglia-Assoziation der c-Fos Typ I⁺ Zellen war in beiden Gruppen nachweisbar. Die c-Fos Typ I⁺ Zellen werden aus diesem Grund im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Mikroglia-assoziiertes Typ eingeordnet.

Diese Färbung ist erst nachträglich an Versuchstieren der STN_{STIM}- und STN_{SHAM}-Gruppe durchgeführt, da erst im Verlauf des Versuches drei verschiedene c-Fos-Zellpopulationen festgestellt wurden. Die Färbung diente primär zur nachträglichen Validierung der c-Fos Typ I⁺ Zellen und ist aus diesem Grund nur kurz im Kapitel Material und Methodik aufgeführt.

3.3 EFFEKTE DER THS AUF ANZAHL UND AKTIVIERUNG DER NEURONE DER SNPC

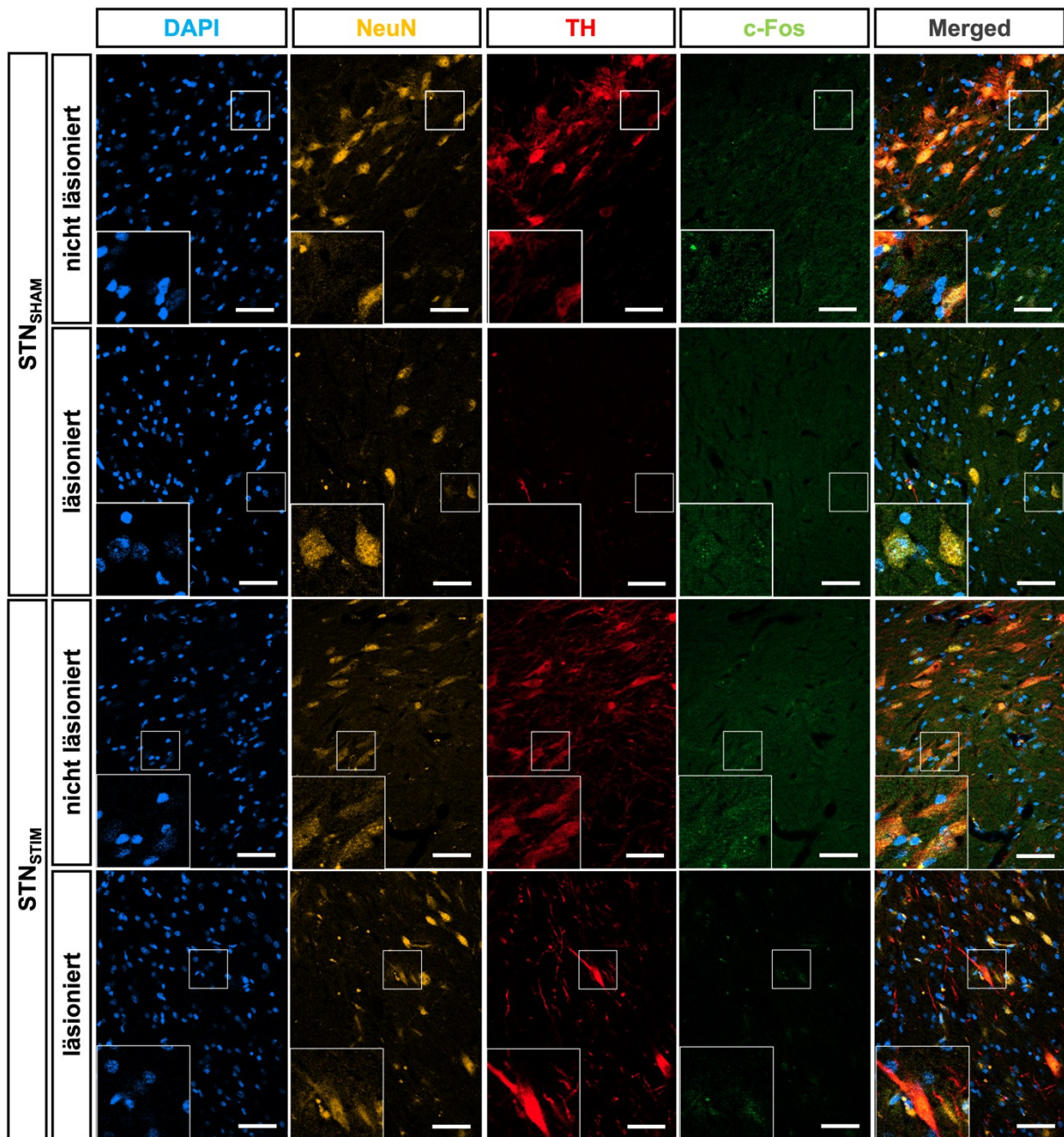


Abbildung 17: Substantia nigra pars compacta – Detailaufnahmen. Detailaufnahmen der läsonierten und nicht-läsonierten Hemisphäre repräsentativer STN_{SHAM}- und STN_{STIM}-Tiere im Bereich der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc; STN_{SHAM}-Gruppe: Tier 302; STN_{STIM}-Gruppe: Tier 216). Dargestellt werden DAPI⁺ (blau), NeuN⁺ (orange), TH⁺ (rot) und c-Fos⁺ Zellen (grün). Alle Bilder enthalten einen weißen Maßstabalken (50 μ m) sowie einen vergrößerten Bildausschnitt in der linken, unteren Ecke. Das kleine, weiße Quadrat (50x50 μ m²) gibt die Position des vergrößerten Bildausschnitts an. Das Bild ist aus der Publikation „*Subthalamic nucleus deep brain stimulation induces nigrostriatal dopaminergic plasticity in a stable rat model of Parkinson's disease*“ übernommen (Helf et al. 2023). Abkürzungen: DAPI – 4'6-Diamidin-2-phenylindol, NeuN – Neuronales Nuclei Antigen, STN – Nucleus subthalamicus, TH – Tyrosinhydroxylase, THS – Tiefe Hirnstimulation.

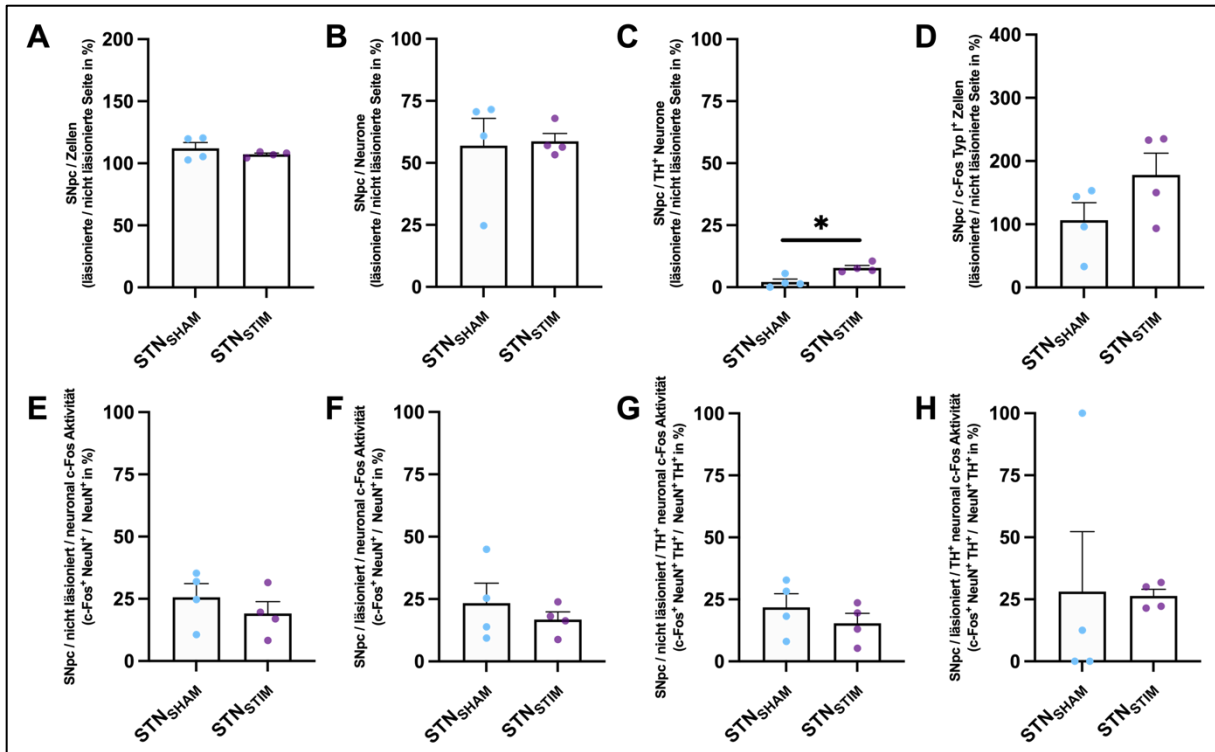


Abbildung 18: Substantia nigra pars compacta – Auswertung. A-D: Gezeigt ist die quantitative Analyse von DAPI⁺ (A), NeuN⁺ (B), TH⁺ (C) und Mikroglia-assoziierten c-Fos Typ I⁺ Zellen (D) der STN_{SHAM}- und STN_{STIM}-Gruppe in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc). Die absoluten Zellzahlen der läsierten Hemisphäre sind auf die absoluten Zellzahlen der nicht-läsierten Hemisphäre normiert. Dargestellt ist der aus der Normierung resultierende Prozentwert. E-H: Gezeigt ist die quantitative Analyse der c-Fos Typ II⁺ Neurone (E+F) und dopaminergen c-Fos Typ II⁺ Neurone (G+H) in der SNpc. Für die c-Fos Typ II⁺ Neurone (E+F) wurde die absolute Zellzahl der läsierten Hemisphäre auf die absolute Gesamtneuronenzahl der nicht-läsierten Hemisphäre normiert. Für die dopaminergen c-Fos Typ II⁺ Neurone (G+H) wurde die absolute Zellzahl der läsierten Hemisphäre auf die absolute Zahl der dopaminergen Neurone der nicht-läsierten Hemisphäre normiert. In beiden Fällen ist der aus der Normierung resultierende Prozentwert dargestellt. Mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde auf Normalverteilung, mittels Levene-Tests auf Varianzhomogenität geprüft. Der Mittelwertvergleich erfolgte mittels t-Tests bzw. t-Tests mit Welch-Korrektur. **Signifikanz:** * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001. *Abkürzungen:* DAPI – 4'-6-Diamidin-2-phenylindol, NeuN – Neuronales Nuclei Antigen, STN – Nucleus subthalamicus, TH – Tyrosinhydroxylase.

3.3.1 EFFEKTE DER THS AUF DIE GESAMTZELLZAHL

Die quantitative Analyse der Gesamtzellzahl im Bereich der SNpc zeigte durchschnittlich 108.819 ± 4.888 Zellen/mm³ in der STN_{SHAM}-Gruppe und 113.090 ± 1.290 Zellen/mm³ in der STN_{STIM}-Gruppe für die nicht-läsierten Hemisphären. Im Bereich der läsierten SNpc lag die relative Gesamtzelldichte für die STN_{SHAM}-Tiere bei $112,1 \pm 4,7$ % und für die STN_{STIM}-Tiere bei $107 \pm 1,0$ % im Vergleich zur Zelldichte der nicht-läsierten Hemisphäre (**Abbildung 18A**). Tendenziell zeigte sich somit eine erhöhte Gesamtzelldichte im Bereich der SNpc der läsierten Hemisphären. Hinsichtlich der Gesamtzellzahl konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden, ein Effekt der THS auf die Gesamtzellzahl lag somit in diesem Versuch nicht vor (P = 0,37).

3.3.2 EFFEKTE DER THS AUF DIE NEURONENZAHL

Die Zahl der Neurone lag im Bereich der SNpc der nicht-läsionierten Hemisphären in der STN_{SHAM}-Gruppe bei 29.756 ± 2181 Neurone/mm³ und in der STN_{STIM}-Gruppe bei 33.056 ± 1708 Neurone/mm³. Im Bereich der läsionierten Hemisphäre lag die relative Dichte bei $56,9 \pm 11,0$ % für die STN_{SHAM}-Gruppe und bei $58,7 \pm 3,2$ % für die STN_{STIM}-Gruppe (**Abbildung 18B**). Es ergab sich kein statistisch relevanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen ($P = 0,89$). Ein signifikanter Effekt der THS auf die Neurone im Bereich der SNpc lag somit in diesem Experiment nicht vor.

3.3.3 EFFEKTE DER THS AUF DIE ANZAHL DOPAMINERGER NEURONE

Die Zahl dopaminerger Neuronen lag im Bereich SNpc der nicht-läsionierten Hemisphäre für die STN_{SHAM}-Gruppe bei 21.319 ± 1102 Neurone/mm³ und für die STN_{STIM}-Gruppe bei 23.715 ± 410 Neurone/mm³. Im Bereich der läsionierten Hemisphäre lag der relative Anteil an dopaminergen Neuronen in der STN_{SHAM}-Gruppe bei $2,13 \pm 1,2$ % und in der STN_{STIM}-Gruppe $7,81 \pm 1,0$ % im Vergleich zur Dichte an dopaminergen Neuronen der nicht-läsionierten Hemisphäre. Im Vergleich beider Versuchsgruppen wies die läsionierte Hemisphäre der STN_{STIM}-Gruppe signifikant mehr dopaminerge Neurone im Bereich der SNpc auf als die läsionierte Hemisphäre der STN_{SHAM}-Gruppe ($P = 0,01$; **Abbildung 18C**). Insgesamt zeigte sich ein signifikanter Effekt der THS auf die Zahl dopaminerger Neurone im Bereich der SNpc.

3.3.4 EFFEKTE DER THS AUF DIE AKTIVITÄT VON ZELLEN/NEURONEN (C-FOS-POSITIVITÄT)

Für den Mikroglia-assoziierten c-Fos Typ I fanden sich im Bereich der nicht-läsionierten Hemisphäre der STN_{SHAM}-Gruppe 2.882 ± 425 c-Fos Typ I⁺ Zellen/mm³. Für die STN_{STIM}-Gruppe konnten 2.951 ± 475 c-Fos Typ I⁺ Zellen/mm³ nachgewiesen werden. Für die läsionierte Hemisphäre ergab sich für die STN_{SHAM}-Gruppe eine relative Dichte von $106,6 \pm 27,5$ % und für die STN_{STIM}-Gruppe von $178,0 \pm 34,5$ % an c-Fos Typ I⁺ Zellen im Vergleich zur Zelldichte der nicht-läsionierten Hemisphäre (**Abbildung 18D**). Es zeigten sich somit im Bereich der läsionierten Hemisphäre der STN_{STIM}-Gruppe mehr c-Fos Typ I⁺ Zellen als in der STN_{SHAM}-Gruppe, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant ($P = 0,16$). Ein Effekt der THS ist aus diesem Grund nicht sicher belegbar, auch wenn eine deutliche Tendenz sichtbar ist.

Die Quantifizierung der c-Fos Typ II⁺ Neurone ergab, dass im Bereich der nicht-läsionierten Hemisphäre der STN_{SHAM}-Gruppe $25,6 \pm 5,5$ % aller Neurone auch c-Fos Typ II⁺ waren. In der STN_{STIM}-Gruppe lag der Anteil bei $19,11 \pm 4,8$ % (**Abbildung 18E**). Im Bereich der läsionierten Hemisphäre waren in der STN_{SHAM}-Gruppe $23,4 \pm 7,9$ % der Neurone auch c-Fos Typ II⁺. In der STN_{STIM}-Gruppe waren es $16,8 \pm 3,1$ % der Neurone (**Abbildung 18F**). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen konnten jedoch nicht gezeigt werden (nicht-läsioniert: $P = 0,40$; läsioniert: $P = 0,47$).

In Bezug auf die dopaminergen Neuronen waren im Bereich der nicht-läsionierten Hemisphäre in der STN_{SHAM}-Gruppe $21,8 \pm 5,5$ % der Neurone positiv für c-Fos Typ II. In der STN_{STIM}-Gruppe waren es $15,4 \pm 4,0$ %. Im Bereich der läsionierten Hemisphären war der relative Anteil insgesamt etwas höher und lag in der STN_{SHAM}-Gruppe bei $28,1 \pm 24,1$ % und in der STN_{STIM}-Gruppe bei $26,4 \pm 2,7$ %. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen ergaben sich jedoch nicht (nicht-läsioniert: $P = 0,38$; läsioniert: $P = 0,95$; **Abbildung 18G+H**). Ein Einfluss der STN-THS auf die c-Fos Typ I⁺ und c-Fos Typ II⁺ Zellen der SNpc zeigte sich in dieser Arbeit somit nicht.

3.4 EFFEKTE DER THS AUF ANZAHL UND AKTIVIERUNG DER NEURONE DER SNPR

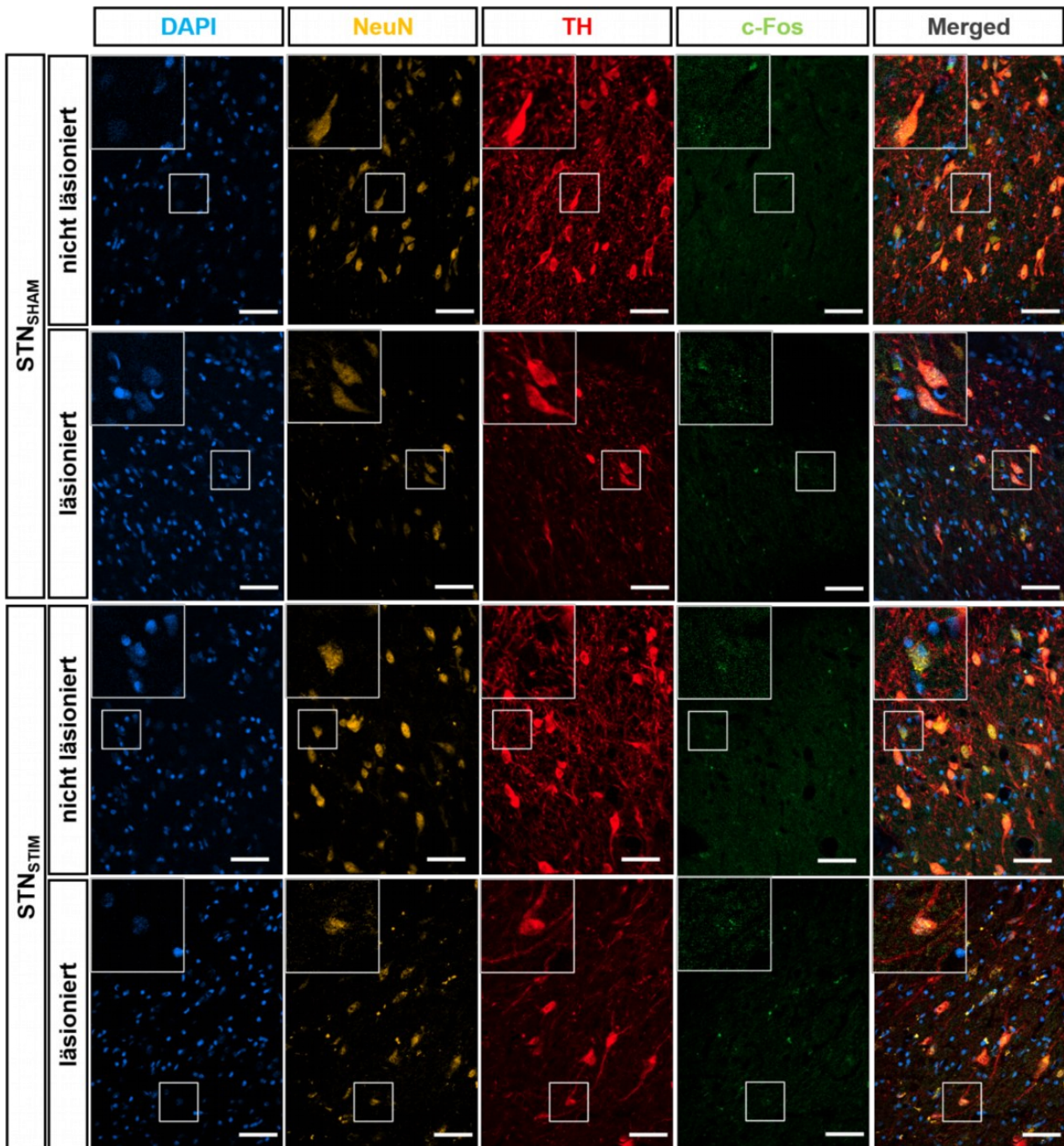


Abbildung 19: Substantia nigra pars reticulata – Detailaufnahmen. Detailaufnahmen der läsiionierten und nicht-läsiionierten Hemisphäre repräsentativer STN_{SHAM}- und STN_{STIM}-Tiere im Bereich der *Substantia nigra pars reticulata* (SNpr; STN_{SHAM}-Gruppe: Tier 302; STN_{STIM}-Gruppe: Tier 216). Dargestellt werden DAPI⁺ (blau), NeuN⁺ (orange), TH⁺ (rot) und c-Fos⁺ Zellen (grün). Alle Bilder enthalten einen weißen Maßstabalken (50 μ m) sowie einen vergrößerten Bildausschnitt in der linken, oberen Ecke. Das kleine, weiße Quadrat (50x50 μ m²) gibt die Position des vergrößerten Bildausschnitts an. *Abkürzungen: DAPI – 4'6-Diamidin-2-phenylindol, NeuN – Neuronales Nuclei Antigen, STN – Nucleus subthalamicus, TH – Tyrosinhydroxylase, THS – Tiefe Hirnstimulation.*

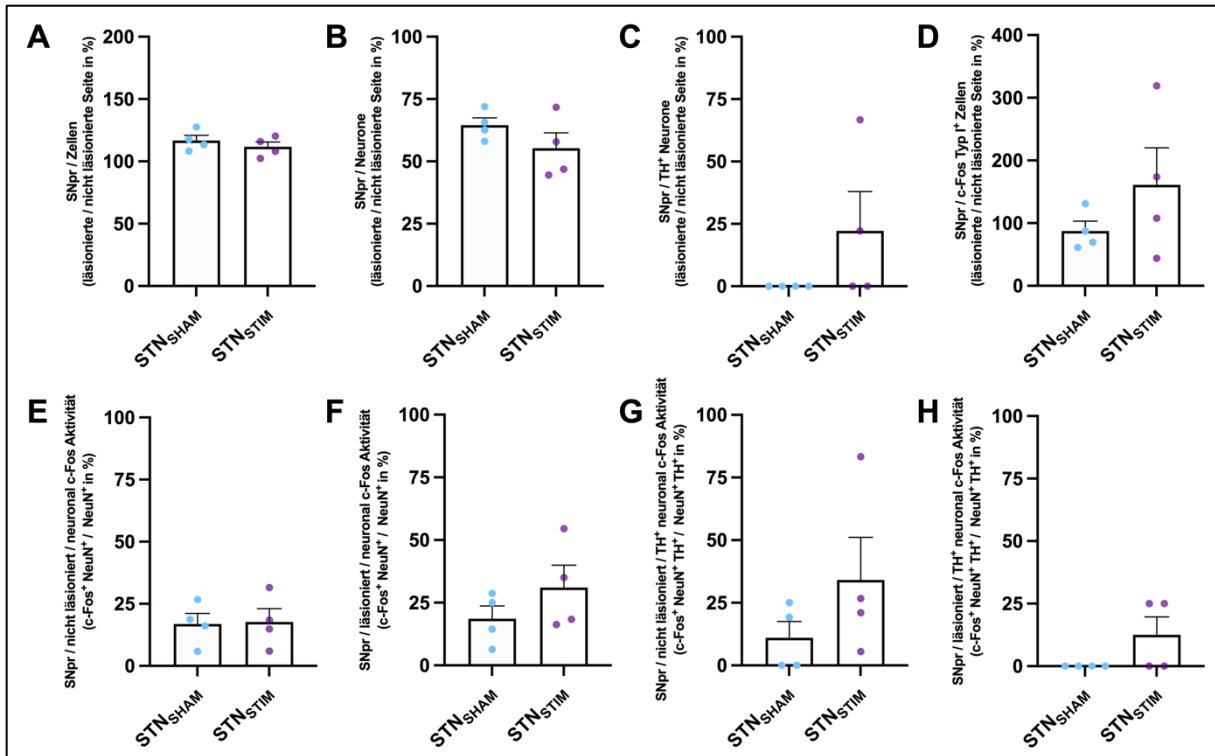


Abbildung 20: Substantia nigra pars reticulata – Auswertung. A-D: Gezeigt ist die quantitative Analyse von DAPI⁺ (A), NeuN⁺ (B), TH⁺ (C) und Mikroglia-assoziierten c-Fos Typ I⁺ Zellen (D) der STN_{SHAM}- und STN_{STIM}-Gruppe in der *Substantia nigra pars reticulata* (SNpr). Die absoluten Zellzahlen der läsionierten Hemisphäre sind auf die absoluten Zellzahlen der nicht-läsionierten Hemisphäre normiert. Dargestellt ist der aus der Normierung resultierende Prozentwert. **E-H:** Gezeigt ist die quantitative Analyse der c-Fos Typ II⁺ Neurone (E+F) und dopaminergen c-Fos Typ II⁺ Neurone (G+H) in der SNpr. Für die c-Fos Typ II⁺ Neurone (E+F) wurde die absolute Zellzahl der läsionierten Hemisphäre auf die absolute Gesamtneuronenzahl der nicht-läsionierten Hemisphäre normiert. Für die dopaminergen c-Fos Typ II⁺ Neurone (G+H) wurde die absolute Zellzahl der läsionierten Hemisphäre auf die absolute Zahl der dopaminergen Neurone der nicht-läsionierten Hemisphäre normiert. In beiden Fällen ist der aus der Normierung resultierende Prozentwert dargestellt. Mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde auf Normalverteilung, mittels Levene-Tests auf Varianzhomogenität geprüft. Der Mittelwertvergleich erfolgte mittels t-Tests bzw. t-Tests mit Welch-Korrektur. **Signifikanz:** * P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001. **Abkürzungen:** DAPI – 4'6-Diamidin-2-phenylindol, NeuN – Neuronales Nuclei Antigen, STN – Nucleus subthalamicus, TH – Tyrosinhydroxylase.

3.4.1 EFFEKTE DER THS AUF DIE GESAMTZELLZAHL

Im Vergleich zur SNpc war die Zelldichte im Bereich der SNpr durchschnittlich geringer (**Abbildungen 18A; Abbildung 20A**). Die SNpr der nicht-läsionierten Hemisphäre wies die STN_{SHAM}-Gruppe 82.300 ± 3.557 Zellen/mm³ und die STN_{STIM}-Gruppe 80.295 ± 3.118 Zellen/mm³ auf. In der SNpr der läsionierten Hemisphären zeigten sich für die STN_{SHAM}-Gruppe ein relativer Anteil von $116,8 \pm 4,1$ % und für die STN_{STIM}-Gruppe ein relativer Anteil von $111,7 \pm 4,0$ % in Bezug auf Gesamtzellzahl der nicht-läsionierten Hemisphäre. Ähnlich wie in der SNpc wies auch die SNpr der läsionierten Hemisphäre eine höhere Zelldichte auf (**Abbildung 20A**). Zwischen den Versuchsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bestimmt werden (P = 0,41). Ein Effekt der THS auf die Gesamtzellzahl im Bereich der SNpr konnte in diesem Experiment somit nicht gezeigt werden.

3.4.2 EFFEKTE DER THS AUF DIE NEURONENZAHL

Im Bereich der SNpr wies die nicht-läsionierte Hemisphäre der STN_{SHAM}-Gruppe 6.684 ± 1.163 Neurone/mm³ auf. Für die STN_{STIM}-Gruppe zeigten sich 5.981 ± 1.214 Neurone/mm³ im Bereich der nicht-läsionierten Hemisphäre. In Bezug auf die Neuronendichte der nicht-läsionierten Hemisphäre war die relative Dichte im Bereich der SNpr der läsionierten Hemisphären in beiden Versuchsgruppen geringer. In der STN_{SHAM}-Gruppe lag der Anteil bei $64,6 \pm 2,9$ % und in der STN_{STIM}-Gruppe bei $55,3 \pm 6,2$ % (**Abbildung 20B**). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen konnten nicht festgestellt werden ($P = 0,24$). Ein Einfluss der THS kann somit nicht belegt werden.

3.4.3 EFFEKTE DER THS AUF DIE ANZAHL DOPAMINERGER NEURONE

In der Fachliteratur wird die SNpr als der Teil der SN definiert, der hauptsächlich GABAerge Neurone aufweist und die SNpc als der Teil, welcher hauptsächlich dopaminerge Neurone enthält. Dementsprechend war der Anteil dopaminerge Neurone im Bereich der SNpr sehr gering (STN_{SHAM}-Gruppe, nicht-läsionierte Hemisphäre: 616 ± 229 dopaminerge Neurone/mm³; STN_{STIM}-Gruppe, nicht-läsionierte Hemisphäre: 503 ± 102 dopaminerge Neurone/mm³; **Abbildung 20C**), wobei die 6-OHDA-Läsion in der STN_{SHAM}-Gruppe zu einer vollständigen Depletion der dopaminergen Neurone im Bereich der läsionierten Hemisphäre führte. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der STN_{STIM}-Gruppe im Bereich der läsionierten Hemisphäre eine geringe Anzahl dopaminerge Neurone mit $22,2 \pm 15,7$ % im Vergleich zur nicht-läsionierten Hemisphäre. Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt werden ($P = 0,25$). Ein Einfluss der THS ist somit nicht belegbar.

3.4.4 EFFEKTE DER THS AUF DIE AKTIVITÄT VON ZELLEN/NEURONEN (c-FOS-POSITIVITÄT)

Die Zelldichte an c-Fos Typ I⁺ Zellen im Bereich der SNpr war im Vergleich zur SNpc in beiden Versuchsgruppen geringer (**Abbildung 18D**; **Abbildung 20D**). Die Dichte an c-Fos Typ I⁺ Zellen im Bereich der SNpr der nicht-läsionierten Hemisphäre lag für die STN_{SHAM}-Gruppe bei 1.372 ± 397 Zellen/mm³ und für die STN_{STIM}-Gruppe bei 1.068 ± 376 Zellen/mm³. Der prozentuale Anteil im Bereich der läsionierten Hemisphäre lag für die STN_{SHAM}-Gruppe bei $87,4 \pm 15,6$ % und für die STN_{STIM}-Gruppe bei $161,2 \pm 58,96$ %. Auch für die SNpr war die Zelldichte an c-Fos Typ I⁺ Zellen im Bereich der läsionierten Hemisphäre in der STN_{STIM}-Gruppe, ähnlich wie in der SNpc, deutlich höher als im Bereich der nicht-läsionierten

Hemisphäre (**Abbildung 20D**). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen konnten jedoch nicht festgestellt werden ($P = 0,16$).

Bei Betrachtung der c-Fos Typ II⁺ Neurone lag der relative Anteil in Bezug auf die Dichte aller Neurone im Bereich der nicht-läsionierten Hemisphäre in der STN_{SHAM}-Gruppe bei $16,8 \pm 4,3$ % und in der STN_{STIM}-Gruppe bei $17,7 \pm 5,3$ % (**Abbildung 20E**). Im Bereich der läsionierten Hemisphäre der STN_{SHAM}-Gruppe waren $18,6 \pm 5,1$ % der Neurone auch c-Fos Typ II⁺. In der STN_{STIM}-Gruppe waren es $31,0 \pm 8,8$ % (**Abbildung 20F**). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen konnten nicht festgestellt werden (nicht-läsioniert: $P = 0,90$; läsioniert: $P = 0,28$).

Von den dopaminergen Neuronen im Bereich der nicht-läsionierten Hemisphäre waren in der STN_{SHAM}-Gruppe $11,1 \pm 6,5$ % auch positiv für c-Fos Typ II⁺. In der STN_{STIM}-Gruppe waren es $34,6 \pm 17,0$ % (**Abbildung 20G**). Wie bereits beschrieben waren im Bereich der läsionierten Hemisphären in der SNpr der STN_{SHAM}-Gruppe keine dopaminergen Neurone feststellbar. Dementsprechend ergab sich nur für die STN_{SHAM}-Gruppe ein prozentualer Anteil dopaminerg c-Fos Typ II⁺ Neuronen, welcher bei $12,5 \pm 7,2$ % lag (**Abbildung 20H**). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen konnten nicht festgestellt werden (nicht-läsioniert: $P = 0,27$; läsioniert: $P = 0,18$).

3.5 EFFEKTE DER THS AUF ANZAHL UND AKTIVIERUNG DER NEURONE DER VTA

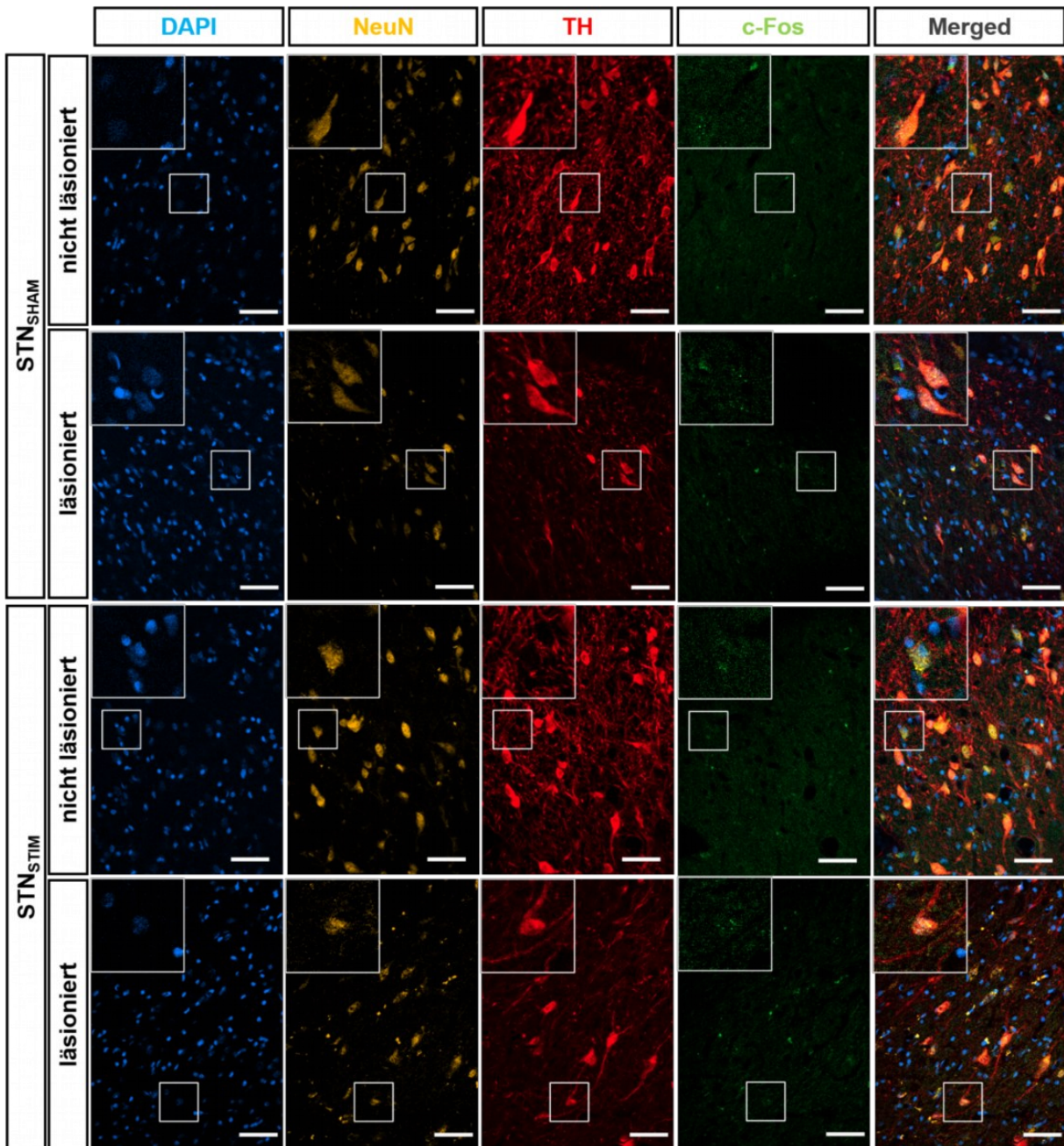


Abbildung 21: Area tegmentalis ventralis – Detailaufnahmen. Detailaufnahmen der läsiionierten und nicht-läsiionierten Hemisphäre repräsentativer STN_{SHAM}- und STN_{STIM}-Tiere im Bereich der *Area tegmentalis ventralis* (VTA; STN_{SHAM}-Gruppe: Tier 302; STN_{STIM}-Gruppe: Tier 216). Dargestellt werden DAPI⁺ (blau), NeuN⁺ (orange), TH⁺ (rot) und c-Fos⁺ Zellen (grün). Alle Bilder enthalten einen weißen Maßstab (50 μ m) sowie einen vergrößerten Bildausschnitt in der linken, oberen Ecke. Das kleine, weiße Quadrat (50x50 μ m²) gibt die Position des vergrößerten Bildausschnitts an. Das Bild ist aus der Publikation „*Subthalamic nucleus deep brain stimulation induces nigrostriatal dopaminergic plasticity in a stable rat model of Parkinson's disease*“ übernommen (Helf et al. 2023). Abkürzungen: DAPI – 4'-Diamidin-2-phenylindol, NeuN – Neuronales Nuclei Antigen, STN – Nucleus subthalamicus, TH – Tyrosinhydroxylase, THS – Tiefe Hirnstimulation.

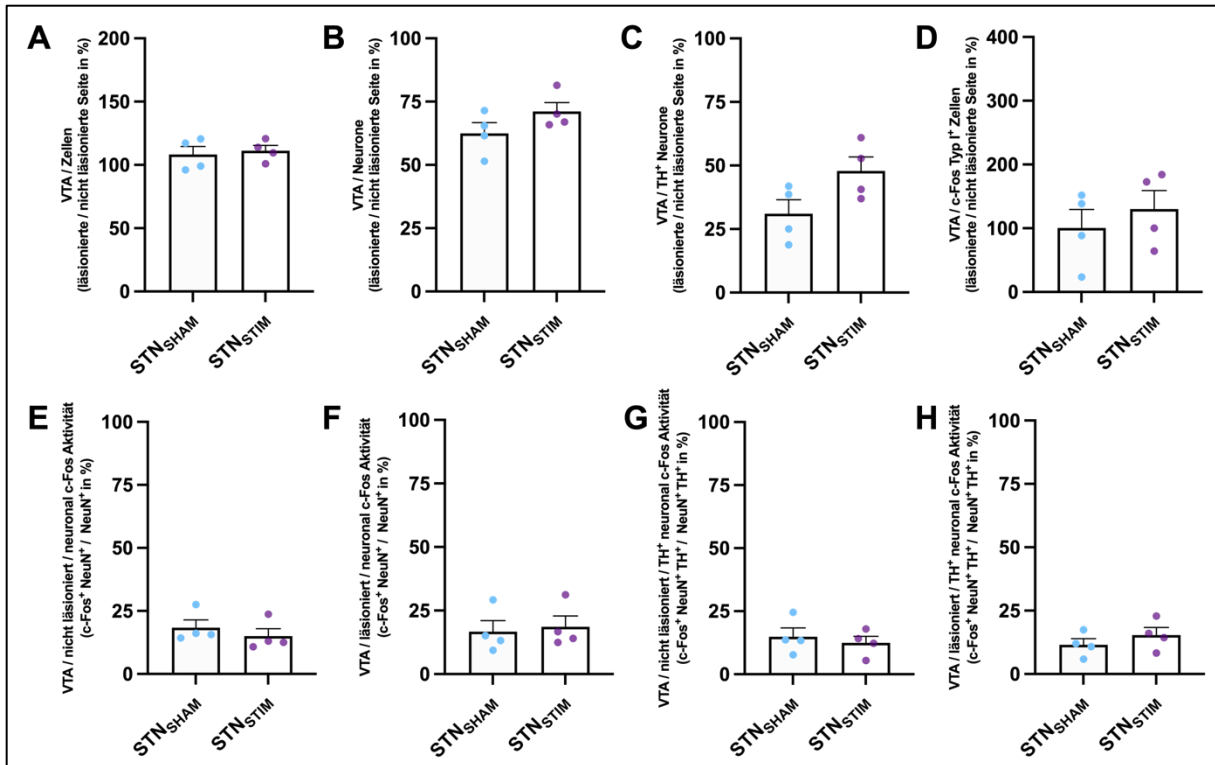


Abbildung 22: Area tegmentalis ventralis – Auswertung. A-D: Gezeigt ist die quantitative Analyse von DAPI⁺ (A), NeuN⁺ (B), TH⁺ (C) und Mikroglia-assoziierten c-Fos Typ I⁺ Zellen (D) der STN_{SHAM}- und STN_{STIM}-Gruppe in der *Area tegmentalis ventralis* (VTA). Die absoluten Zellzahlen der läsionierten Hemisphäre sind auf die absoluten Zellzahlen der nicht-läsionierten Hemisphäre normiert. Dargestellt ist der aus der Normierung resultierende Prozentwert. E-H: Gezeigt ist die quantitative Analyse der c-Fos Typ II⁺ Neurone (E+F) und dopaminergen c-Fos Typ II⁺ Neurone (G+H) in der VTA. Für die c-Fos Typ II⁺ Neurone (E+F) wurde die absolute Zellzahl der läsionierten Hemisphäre auf die absolute Gesamtneuronenzahl der nicht-läsionierten Hemisphäre normiert. Für die dopaminergen c-Fos Typ II⁺ Neurone (G+H) wurde die absolute Zellzahl der läsionierten Hemisphäre auf die absolute Zahl der dopaminergen Neurone der nicht-läsionierten Hemisphäre normiert. In beiden Fällen ist der aus der Normierung resultierende Prozentwert dargestellt. Mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde auf Normalverteilung, mittels Levene-Tests auf Varianzhomogenität geprüft. Der Mittelwertvergleich erfolgte mittels t-Tests bzw. t-Tests mit Welch-Korrektur. **Signifikanz:** * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001. *Abkürzungen:* DAPI – 4'-Diamidin-2-phenylindol, NeuN – Neuronales Nuclei Antigen, STN – Nucleus subthalamicus, TH – Tyrosinhydroxylase.

3.5.1 EFFEKTE DER THS AUF DIE GESAMTZELLZAHL

In der VTA der nicht-läsionierten Hemisphäre zeigten sich in der STN_{SHAM}-Gruppe 97.708 ± 4.948 Zellen/mm³ und in der STN_{STIM}-Gruppe bei 104.219 ± 3.127 Zellen/mm³. Auf der läsionierten Seite lag der relative Anteil in der STN_{SHAM}-Gruppe bei $108,3 \pm 6,2$ % und in der STN_{STIM}-Gruppe bei $111,3 \pm 4,2$ %. Tendenziell zeigte sich so auch in der VTA der läsionierten Seite eine erhöhte Zelldichte. Signifikante Gruppenunterschiede zeigten sich nicht (P = 0,70).

3.5.2 EFFEKTE DER THS AUF DIE NEURONENZAHL

Im Bereich der VTA der nicht-läsionierten Hemisphäre ergab für die STN_{SHAM}-Gruppe eine Dichte von 21.823 ± 764 Neurone/mm³ und für die STN_{STIM}-Gruppe eine Dichte von 25.538 ± 291 Neurone/mm³. Der relative Anteil im Bereich der läsionierten Hemisphäre war in

beiden Gruppen etwas geringer und lag in der STN_{SHAM}-Gruppe bei $62,5 \pm 4,2$ % und in der STN_{STIM}-Gruppe bei $71,1 \pm 3,5$ % (**Abbildung 22B**). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen zeigten sich nicht ($P = 0,17$). Ein stimulierender Effekt der THS auf die Neurone im Bereich der VTA kann somit in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

3.5.3 EFFEKTE DER THS AUF DIE ANZAHL DOPAMINERGER NEURONE

Die Zahl dopaminergener Neurone lag im Bereich der VTA der nicht-läsionierten Hemisphäre bei 16.024 ± 1.238 Neurone/mm³ für die STN_{SHAM}-Gruppe und bei 16.319 ± 1.243 Neurone/mm³ für die STN_{STIM}-Gruppe. Im Bereich der läsionierten Hemisphäre ergab sich in der VTA der STN_{SHAM}-Gruppe ein Anteil von $31,1 \pm 5,5$ % und in der STN_{STIM}-Gruppe von $47,9 \pm 5,5$ % (**Abbildung 22C**). Auch für die dopaminergen Neurone zeigten sich im Bereich der VTA zwischen beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede ($P = 0,08$).

3.5.4 EFFEKTE DER THS AUF DIE AKTIVITÄT VON ZELLEN/ NEURONEN (C-FOS-POSITIVITÄT)

Die Zelldichte von c-Fos Typ I⁺ Zellen lag in der STN_{SHAM}-Gruppe im Bereich der nicht-läsionierten Hemisphäre bei 16.024 ± 1.238 Zellen/mm³, für die STN_{STIM}-Gruppe wurden 2.587 ± 713 Zellen/mm³ festgestellt. Im Bereich der läsionierten Hemisphären lag der relative Anteil c-Fos Typ I⁺ Zellen bei $100,5 \pm 29,1$ % in der STN_{SHAM}-Gruppe und bei $130,3 \pm 28,9$ % in der STN_{STIM}-Gruppe ($P = 0,50$, **Abbildung 22D**).

Im Bereich der VTA der STN_{SHAM}-Gruppe waren im Bereich der nicht-läsionierten Hemisphäre $18,4 \pm 3,1$ % der Neurone auch c-Fos Typ II⁺. In der STN_{STIM}-Gruppe ergab sich ein Anteil von $15,0 \pm 2,9$ %. Im Bereich der läsionierten Hemisphäre lag der Anteil in der STN_{SHAM}-Gruppe bei $16,7 \pm 4,3$ % und in der STN_{STIM}-Gruppe bei $18,6 \pm 4,3$ % (**Abbildung 22E+F**). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen ergaben sich nicht ($P = 0,77$).

Für die dopaminergen c-Fos Typ II⁺ Neurone der nicht-läsionierten Hemisphäre konnte ein Anteil von $14,8 \pm 3,5$ % in der STN_{SHAM}-Gruppe und von $12,5 \pm 2,6$ % in der STN_{STIM}-Gruppe an der Gesamtzahl dopaminergener Neurone festgestellt werden (**Abbildung 22G**). Für die VTA der läsionierten Hemisphäre waren es STN_{SHAM}-Gruppe $11,5 \pm 2,4$ % und in der STN_{STIM}-Gruppe $15,4 \pm 3,0$ % (**Abbildung 22H**). Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht ($P = 0,35$).

IV. DISKUSSION

Ziel dieser Promotionsarbeit ist die Untersuchung der zeitlich latenten Effekte einer siebentägigen THS des STN im 6-OHDA-Modell der Ratte. Hierbei sind die zentralen Diskussionspunkte die Auswirkungen der THS auf die Anzahl dopaminerger Neurone in wesentlichen Kerngebieten der Basalganglienschleife (SN und VTA) sowie die neuronale Aktivität und Plastizität in diesen Kerngebieten.

4.1 ZEIGEN LÄSION UND THS EFFEKTE AUF DIE GESAMTZELLZAHL?

Betrachtet man zunächst den Einfluss der Läsion auf die Gesamtzellzahl im untersuchten 6-OHDA-Modell, ist tendenziell ein Läsionseffekt mit einer erhöhten Gesamtzelldichte im Bereich der läsionierten Hemisphäre in allen untersuchten Hirnregionen unabhängig von der Stimulation erkennbar. Eine mögliche Erklärung ist eine Immunantwort auf die 6-OHDA-Injektion oder die Elektrodenimplantation (Theodore et al. 2015). Die im Folgenden genannten Überlegungen sind durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht klar belegbar, da der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung von neuronaler Plastizität des dopaminergen Systems nach STN-THS lag. Gliazellen und Immunsystem des ZNS stehen in engem Zusammenhang zur neuronalen Plastizität. Eine kurze Betrachtung dieses Zusammenhangs im Kontext des aufgetretenen Läsionseffekts ist somit sinnvoll.

Für die These einer gesteigerten Immunantwort nach 6-OHDA-Injektion spricht, dass die Injektion von 6-OHDA einen über Wochen andauernden Apoptose-Prozess im Bereich der SNpc hervorrufen kann. Durch diese Apoptose kann auch eine langanhaltend erhöhte Migration von Gliazellen des Immunsystems, wie zum Beispiel Mikroglia, bewirkt werden (Apetz et al. 2019; Mendes-Pinheiro et al. 2021; Rodriguez-Pallares et al. 2007). Auch eine gesteigerte Migration von Immunzellen über die eigentliche Apoptose hinaus ist hierbei wahrscheinlich. Mendes-Pinheiro et al. beschrieben eine erhöhte Dichte von Mikroglia in läsionierten Arealen noch 14 Wochen nach 6-OHDA-Injektion im 6-OHDA-Modell der Maus, jedoch ist dies bis jetzt noch nicht im 6-OHDA-Modell der Ratte überprüft worden. Ähnliche Verschiebungen in topografisch benachbarten oder neuronal verbundenen Kerngebieten, wie der VTA und der SNpr, könnten auch durch die 6-OHDA induzierte dopaminerge Degeneration in der SNpc hervorgerufen werden. Eine ähnliche Hypothese wurde bereits durch Pinheiro Campos et al. aufgestellt, die in ihrem 6-OHDA-Modell der Ratte Inflamationsprozesse ohne deutlichen Zelluntergang im Bereich des *Striatum* auf die dopaminerge Degeneration im Bereich der SNpc zurückführten (Pinheiro Campos et al. 2022).

Alternativ könnte die erhöhte Zellzahl auch eine Reaktion auf die Elektrodenimplantation sein. Pflüger et al. konnten zeigen, dass sich in den ersten zwei Wochen nach Implantation eine Glia-Narbe um die implantierte Elektrode bildet (Pflüger et al. 2019). Alle in dieser Arbeit untersuchten Kerngebiete sind nicht unmittelbar von der Elektrodenimplantation in den STN betroffen, weisen jedoch eine topografische Nähe zum STN auf (Paxinos et al. 2006). Zudem sind sowohl die SNpc als auch die SNpr neuronal mit dem STN verbunden (Hacke 2016). Kommt es nun zur Apoptose oder Nekrose eines Neurons im Rahmen der Elektrodenimplantation werden Zytokine in den Extrazellularraum freigesetzt (Grembecka et al. 2021). Diese freigesetzten Zytokine können auch immunmodulierende Wirkungen in benachbarten oder afferent und efferent mit dem STN verbundenen Kerngebieten hervorrufen. Nach einer Elektrodenimplantation in den STN konnte durch Hirshler et al. eine gesteigerte Immunantwort in benachbarten Kerngebieten, wie der SN und dem *Striatum*, noch acht Wochen nach der Implantation festgestellt werden (Hirshler et al. 2010).

Betrachtet man nun die Gesamtzellzahl in Bezug auf die STN-THS, zeigen sich keine Effekte im hier untersuchten 6-OHDA-Modell. Ähnliche Ergebnisse stellten auch Fauser et al. nach einer drei wöchigen unilateralen Stimulation im gleichen Modell fest (Fauser et al. 2021).

Zusammenfassend weist das 6-OHDA-Modell der Ratte nach der Läsion eine erhöhte Gesamtzellzahl auf der läsierten bzw. stimulierten Seite auf. Ein Einfluss des Immunsystems scheint hierbei wahrscheinlich, kann jedoch aufgrund des Versuchsdesigns nicht belegt werden. Jedoch sollten Effekte von Läsion und THS auf das Immunsystem insbesondere in Zusammenhang mit neuronaler Plastizität in weiteren Arbeiten untersucht werden. Die STN-THS hat in diesem Modell keinen Einfluss auf die Gesamtzellzahl von SN oder VTA.

4.2 BEWIRKT DIE THS NEUROPROLIFERATIVE ODER NEUROPROTEKTIVE EFFEKTE?

Das 6-OHDA-Modell zeigt erwartungsgemäß eine deutlich reduzierte Anzahl an Neuronen im Bereich der SNpc der läsierten Hemisphäre in beiden Gruppen (Fauser et al. 2021; Kirik et al. 1998). Ein Effekt der STN-THS auf die Anzahl an Neuronen nach siebentägiger Stimulation ist nicht festzustellen und bestätigt somit die Ergebnisse von Pflüger et al. (Pflüger et al. 2019). Ein genereller neuroproliferativer oder auch neuroprotektiver Effekt der STN-THS im Bereich der SNpc ist daher unwahrscheinlich.

Im Vergleich zur SNpc besteht die SNpr hauptsächlich aus GABAergen Neuronen (Zhou et al. 2009). Der Anteil an Neuronen generell und insbesondere an dopaminergen Neuronen im Bereich der SNpr ist sehr gering. Die Vulnerabilität der SNpr gegenüber 6-OHDA, welches selektiv auf dopaminerge Neurone wirkt, ist somit deutlich geringer ausgeprägt (Kirik et al. 1998; Masini et al. 2021). Dennoch kann auch in der SNpr ein Effekt der Läsion auf die Gesamtneuronenzahl nachgewiesen werden, welcher durch weiterführende Untersuchungen der GABAergen Zellpopulation genauer charakterisiert werden sollte. Ein signifikanter Effekt der STN-THS im Bereich SNpr auf die neuronale Gesamtzahl kann in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die ausbleibende Signifikanz ist möglicherweise in einem großen SEM und einer geringen Anzahl an Versuchstieren begründet, da tendenziell ein stimulierender Effekt zu erkennen ist. Aus diesem Grund sollte in weiteren Arbeiten ein möglicher Effekt der STN-THS auf Neurone der SNpr untersucht werden. Hierbei sollte insbesondere die GABAerge Population betrachtet werden.

Auch im Bereich der VTA zeigt die 6-OHDA-Injektion eine Reduktion der Neuronenzahl. Insgesamt war diese weniger intensiv als in der SNpc. Dies war absehbar, da die neuronale Degeneration von dopaminergen Neuronen der VTA nach der Injektion von 6-OHDA in das MVB geringer ausfällt als im Bereich der SNpc (Masini et al. 2021; Kirik et al. 1998). Ähnlich wie in der SNpc ist auch in der VTA kein Effekt der STN-THS auf die Neuronenzahl nach siebentägiger Stimulation festzustellen. Ein neuroproliferativer oder auch neurorestaurativer Effekt nach siebentägiger STN-THS ist auch in der VTA unwahrscheinlich.

In Bezug auf eine Stimulation der Neurogenese durch STN-THS war ein ausbleibender Effekt in den untersuchten Kerngebieten zu erwarten. Zwar konnten zum Beispiel Fauser et al. eine stimulierende Wirkung von STN-THS auf die Neurogenese im identischen 6-OHDA-Modell der Ratte feststellen. Jedoch erfolgte in dem Versuch von Fauser et al. eine fünfwöchige, bilaterale STN-THS und die Neurogenese wurde lediglich im *Bulbus olfactorius* nachgewiesen (Fauser et al. 2023). Eine Induktion einer relevanten Neuroproliferation durch eine siebentägige,

unilaterale STN-THS erscheint insgesamt sehr unwahrscheinlich, da die Dauer der Neurogenese in der Entwicklungsphase von *Rodentia* bereits drei Wochen beträgt und hauptsächlich am Ventrikel stattfindet (Sahu et al. 2019). Zudem ist die Neurogenese im adulten Rattengehirn fast ausschließlich auf den *Bulbus olfactorius* und *Hippocampus* begrenzt (Gould 2007). Eine Neurogenese außerhalb dieser Kerngebiete wird insgesamt sehr kontrovers diskutiert (Frielingsdorf et al. 2004; Rakic 2002; Zhao et al. 2003). Zhao et al. hatten hierbei von einer langsamen Neurogenese in der SNpc in adulten Gehirnen von *Rodentia* berichtet und in diesem Zusammenhang eine Steigerung der Neurogenese durch eine Toxin-induzierte neuronale Degeneration dargelegt. Allerdings konnten Frielingsdorf et al. diese Ergebnisse in späteren Versuchen nicht reproduzieren. Insbesondere wurde durch Frielingsdorf et al. im 6-OHDA-Modell keine Neurogenese in der SNpc oder anderen Teilen des dopaminergen Systems nachgewiesen (Frielingsdorf et al. 2004).

Im Gegensatz zur Neurogenese wäre jedoch eine neuroprotektive Wirkung der STN-THS im 6-OHDA-Modell durchaus möglich und ist in der Vergangenheit bereits mehrfach beschrieben worden (Fauser et al. 2021; Maesawa et al. 2004; Temel et al. 2006). In diesem Zusammenhang wurden immunmodulierende und antiinflammatorische Wirkungen als potentielle Ursachen einer neuroprotektiven Wirkung der STN-THS genannt (Chen et al. 2020). Allerdings trat eine solche neuroprotektive Wirkung der STN-THS in den Arbeiten von Fauser et al. und Temel et al. erst nach fünf Wochen durchgängiger Stimulation ein. Zusätzlich wurde in beiden Arbeiten bilateral stimuliert. Eine Erklärung für den ausbleibenden Effekt einer generellen Neuroprotektion in der hier vorgestellten Arbeit könnte somit die unilaterale Stimulation oder auch eine zu kurze Stimulationsdauer sein. Die Bedeutung einer suffizienten Stimulationsdauer wird insbesondere klar, wenn man die zellbiologischen Grundlagen einer Neuroprotektion betrachtet. In Bezug auf das 6-OHDA-Modell berichten Kirk et al. von einem protrahierten Zellverlust der noch Monate nach einer neuronalen Schädigung andauern kann (Kirk et al. 1998). Sauer et al. postulieren in diesem Zusammenhang eine stetige Apoptose von Neuronen mit initial nur partiell geschädigter Zellmembran. Diese partielle Schädigung der Membran resultiere in einem ionischem Ungleichgewicht induziert durch einen übermäßigen Einstrom positiver Calciumionen in den intrazellulären Raum, durch den auch initial nur partiell geschädigte Neurone langfristig nicht überleben können (Sauer et al. 1994). Eine durch STN-THS induzierte Depolarisation von Neuronen könnte den Influx von positiven Calciumionen abschwächen und so der neuronalen Apoptose entgegenwirken (Benazzouz et al. 1995). Es scheint jedoch nachvollziehbar, dass für die Beeinflussung solcher protrahierten Prozesse eine mehrwöchige Stimulationsdauer wie bei Fauser et al. und Temel et al. notwendig ist. Die in dieser Arbeit angewendete Stimulationsdauer von sieben Tagen war für einen solchen Effekt wahrscheinlich zu kurz.

Jedoch war eine unilaterale STN-THS von zwei Wochen in den Arbeiten von Maesawa et al. und Spieles-Engemann et al. bereits ausreichend, um eine relevante Neuroprotektion hervorzurufen (Maesawa et al. 2004; Spieles-Engemann et al. 2010). Als mögliche Ursache eines solchen neuroprotektiven Effekts beschreiben Spieles-Engemann et al., dass STN-THS die intrazelluläre Aufnahme von 6-OHDA hemmt und dadurch dessen degenerative Wirkung verringert wird. Eine solche Begründung ist nachvollziehbar, da sowohl Spieles-Engemann et al. als auch Maesawa et al. im unmittelbaren Apoptose-Prozess kurz nach Applikation von 6-OHDA stimulierten. In der hier vorgelegten Arbeit wurde jedoch mindestens sieben Wochen zwischen 6-OHDA-Injektion und STN-THS gewartet, sodass von einem relativ stabil degenerierten System auszugehen ist und somit eine Hemmung der Aufnahme von 6-OHDA durch STN-THS als neuroprotektive Wirkung nicht mehr ins Gewicht fallen sollte (Kirik et al. 1998; Rentsch et al. 2019; Spieles-Engemann et al. 2010; Yuan et al. 2005). Durch diese längere Dauer zwischen 6-OHDA-Injektion und STN-THS fiel jedoch auch die neuronale Degeneration sehr viel intensiver aus (Masini et al. 2021; Yuan et al. 2005). Zusammenhänge zwischen noch erhaltener Integrität und Funktionalität neuronaler Netzwerke als Grundlage für eine bessere Wirkung der THS bei IPS-Patienten wurden bereits durch Schumacher et al. berichtet (Schumacher et al. 2021). In Bezug auf das 6-OHDA-Modell postulierten Spieles-Engemann et al., dass es maximal zu einem Verlust von 50 Prozent der Neurone kommen darf, um eine neuroprotektive Wirkung einer STN-THS zu erreichen (Spieles-Engemann et al. 2010). Eine weitere Ursache für das Ausbleiben einer generellen neuroprotektiven Wirkung von STN-THS in dieser Arbeit könnte somit auch eine beeinträchtigte neuronale Funktionalität der einzelnen Kerngebiete sein. Ein weiterer wichtiger Punkt, der durch die Arbeitsgruppe von Maesawa et al. nicht durchgeführt wurde, ist die Differenzierung zwischen Neuronen und dopaminergen Neuronen. Diese Differenzierung ist für eine korrekte Bewertung einer generellen Neuroprotektion in Abgrenzung von möglichen Auswirkungen von STN-THS auf zelluläre Vorgänge wie zum Beispiel enzymatische Prozesse notwendig (Temel et al. 2006). Dieser Punkt gewinnt an Bedeutung, da Paul et al. berichten, dass eine chemische Ablation des STN im 6-OHDA-Modell nicht generell zu einer Neuroprotektion führt, sondern eine Hochregulierung der TH und somit eine Neurorestauration bewirkt (Paul et al. 2004).

Zusammenfassend zeigt sich ein deutlicher Läsionseffekt auf die Anzahl an Neuronen in SNpc, VTA und auch SNpr. Die THS hingegen hat keinen generellen neuroprotektiven Effekt auf die Gesamtneuronenzahl in den untersuchten Kerngebieten.

4.3 BEWIRKT DIE THS NEURORESTAURATIVE EFFEKTE IM DOPAMINERGEN SYSTEM?

In dieser Arbeit zeigt sich ein deutlicher Effekt der Läsion auf die dopaminergen Neurone im Bereich der SNpc. Im Kontrast zur Gesamtneuronenzahl kann in der SNpc zusätzlich ein stimulierender Effekt der STN-THS auf die dopaminergen Neurone dargestellt werden. Stimulierende Effekte auf dopaminerge Neurone im Sinne einer Neuroprotektion durch STN-THS sind bereits in mehreren vorangegangenen Studien beschrieben worden (Chen et al. 2020; Fauser et al. 2021; Maesawa et al. 2004; Temel et al. 2006). Gänzlich neu ist jedoch, dass ein Effekt der STN-THS bereits nach nur sieben Tagen Stimulation in einem Tiermodell mit stabil degeneriertem dopaminergem System eintritt.

Mechanistisch scheint ein Effekt der STN-THS auf die Neurogenese ausgeschlossen, da die Gesamtzahl der Neurone in der SNpc unverändert ist. Auch eine mögliche dopaminerge Neuroprotektion im Sinne einer Rettung von absterbenden Neuronen ist in einem stabil degenerierten System eher unwahrscheinlich. Zusätzlich hätte ein solcher neuroprotektiver Effekt auch Auswirkungen auf die Gesamtzahl der Neurone in der SNpc haben müssen. Im Gegensatz dazu wäre eine dopaminerge Neurorestoration im Sinne eines stimulierenden Einflusses auf die TH-Expression beziehungsweise Re-Expression in nicht vollständig abgestorbenen, dopaminergen Neuronen vorstellbar. Ein solcher selektiver Effekt auf das dopaminerge System der SNpc wäre auch bei unveränderter Gesamtneuronenzahl möglich. Aus diesem Grund ist eine Stimulation der TH-Expression in den dopaminergen Neuronen der SNpc die wahrscheinlichste Ursache für den in dieser Arbeit aufgetretenen Effekt der STN-THS (He et al. 2014). Hierbei scheint der STN als Stimulationsgebiet eine entscheidende Bedingung für die neurorestaurative Wirkung der THS zu sein, denn es existieren auch Studien, die keine Effekte einer THS auf die dopaminergen Neurone der SNpc nachweisen konnten (Fauser et al. 2021; Fischer et al. 2015). In diesen Studien wurden nach einer Stimulation von GP oder EP keine Veränderung im dopaminergen System der SNpc festgestellt. Eine dopaminerge Neurorestoration ist somit wahrscheinlich ein Stimulationsort-spezifischer Effekt für die STN-THS.

Eine Erklärung für diesen Stimulationsort-spezifischen Effekt könnte die Arbeit von Paul et al. bieten. Paul et al. konnten im 6-OHDA-Modell durch eine chemische Ablation des STN mittels Ibotensäure eine spezifische Stimulation der TH-Expression im Bereich der SNpc hervorrufen. Die Gesamtneuronenzahl in der SNpc blieb hierbei unverändert. Paul et al. erklärten diese Diskrepanz durch die wegfallende inhibitorische Projektion des STN auf die SNpr, welche konsekutiv auch zu einer Disinhibition der dopaminergen Neurone in der SNpc und somit zu einer Stimulation der TH-Expression führt (Paul et al. 2004). Natürlich ist eine chemische

Ablation nicht mit einer elektrischen Ablation gleichzusetzen, jedoch fiel auch im Fall einer elektrischen Ablation die inhibitorische Projektion des STN auf die SNpr weg und hätte dementsprechend einen ähnlichen Effekt auf die SNpc.

In einem weiteren potentiellen Mechanismus spielen Wachstumsfaktoren, wie z.B. der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) eine wichtige Rolle. Im 6-OHDA-Modell konnte bereits gezeigt werden, dass STN-THS die Ausschüttung von BDNF bewirkt (Fischer et al. 2017; Spieles-Engemann et al. 2011). Dieses aktiviert eine Signalkaskade via Aktivierung von *cAMP response element-binding protein* (CREB; Andreska et al. 2020; Baydyuk et al. 2011; Kim et al. 1993; McKinnon et al. 2019). CREB agiert als Transkriptionsfaktor, welches cAMP gesteuert an DNA binden kann und die Transkription von TH steigert (Finkbeiner et al. 1997; Kim et al. 1993). Eine solche regulierende Wirkung durch BDNF über CREB auf die TH-Expression wurde bereits durch Fukuchi et al. beschrieben (Fukuchi et al. 2010). Auch im klinischen Zusammenhang bietet eine solche durch stimulierte TH-Expression erhöhte endogene L-Dopa-Synthese eine Erklärung für den langfristig verringerten Bedarf von L-Dopa nach dem Beginn der THS bei IPS-Patienten (Moro et al. 1999; Shin et al. 2012). Gegen diese Überlegung spricht, dass Statz et al. im gleichen Versuchsmodell, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde, keine Alteration von BDNF nach siebentägiger, unilateraler STN-THS zeigen konnten. Es wurde hierbei die BDNF-Konzentration unter anderem in den Kerngebieten SN, STN, GP sowie im *Cortex* untersucht, jedoch wurde das *Striatum* nicht überprüft (Statz et al. 2023). Die BDNF-Ausschüttung könnte jedoch genau in diesem Kerngebiet erfolgen, da BDNF hauptsächlich im Bereich der Synapsen ausgeschüttet wird und der eigentliche Ort des Dopaminmangels im 6-OHDA-Modell der Ratte im Bereich des *Striatum* und nicht im Bereich der SNpc liegt (Lin et al. 2018). Folglich müsste das Neuron, welches auf den Dopaminmangel reagiert und somit BDNF ausschüttet, ebenfalls im *Striatum* liegen. In diesem Zusammenhang konnten Miller et al. bereits eine erhöhte BDNF-Konzentration nach vierwöchiger STN-THS in einem *α-Synuclein Prefomed Fibril* (PFF) Rattenmodell nachweisen (Miller et al. 2021). In Bezug auf eine vermehrte Ausschüttung von Neurotrophinen nach STN-THS könnten auch Zellen des Immunsystems eine wesentliche Rolle spielen. Eine immunmodulierende Wirkung von STN-THS könnte somit einen neurorestaurativen Effekt zusätzlich begünstigen (Grembecka et al. 2021). Immunmodulierende Wirkungen wurden bereits im 6-OHDA-Modell der Ratte beschrieben und auch in dieser Arbeit spricht die Erhöhung der Gesamtzellzahl als erstes Indiz für eine solche These. Elektrische Felder induzieren die Differenzierung von naiven zu regulatorischen T-Zellen (Arnold et al. 2019; Machhi et al. 2020). Diese fördern die Ausschüttung von neurotrophischen Faktoren durch zum Beispiel antiinflammatorische Mikroglia (M2 Immunantwort), wirken immunsuppressiv auf die zytotoxische Immunantwort und begünstigen so eine Neuroprotektion oder auch Neurorestoration (Machhi et al. 2020;

Park et al. 2022). Ob tatsächlich eine späte Immunantwort 14 Tage nach der Elektrodenimplantation und acht Wochen nach der Läsion einen neurorestaurativen Effekt fördert, sollte jedoch in weiteren Studien untersucht werden.

Ein dritter Erklärungsansatz für eine erhöhte TH-Expression nach STN-THS ist, dass die TH einer Feedbackinhibition durch Dopamin unterliegt (Lindgren et al. 2001). Durch die THS wird die Ausschüttung von Dopamin gefördert, dadurch sinkt die intrazelluläre Konzentration an Dopamin und dessen inhibitorische Wirkung auf die TH-Expression könnte sich so reduzieren (He et al. 2014; Lee et al. 2006; Shon et al. 2010).

Ein vierter Mechanismus für eine erhöhte TH-Expression nach STN-THS könnte eine 6-OHDA vermittelte Stimulation der TH Expression sein (Karl 2019). A. Karl stellt hierbei eine interessante Vermutung über eine durch adrenerge Rezeptoren vermittelte Wirkung von 6-OHDA auf die TH-Expression auf. Sie beschreibt in diesem Zusammenhang eine erhöhte striatale Affinität und Dichte von D₂-Rezeptoren nach 6-OHDA-Injektion in das MVB. D₂-Rezeptoren sind in den Regulationsmechanismus der TH eingebunden. Obwohl auch chronische Effekte nach der Injektion von 6-OHDA im Rattenmodell bereits beschrieben wurden, sind diese Effekte im vorliegenden Modell einer stabilen Läsion sehr unwahrscheinlich (Jollivet et al. 2004; Karl 2019). Ebenfalls gegen die Hypothese eines Effekts von 6-OHDA auf den TH-Regulationsmechanismus spricht der signifikante Unterschied in der Zahl dopaminergener Neurone zwischen beiden Versuchsgruppen, obwohl beide Versuchsgruppen einer 6-OHDA-Läsion unterlagen. Zudem haben D₂-Rezeptoren einen inhibitorischen Einfluss auf die TH-Expression. Da 6-OHDA die Dichte von D₂-Rezeptoren steigert, spricht dies ebenfalls gegen die Hypothese der 6-OHDA vermittelten TH-Expression von A. Karl (Gerfen et al. 1990; Lindgren et al. 2001).

Insgesamt zeigt sich ein deutlicher Effekt der STN-THS auf das dopaminerge System im Sinne einer erhöhten Zahl dopaminergener Neurone im Bereich der SNpc. Hierbei handelt es sich am ehesten um einen direkten Einfluss der STN-THS auf die Expression von TH. Die Aufklärung des Mechanismus dahinter erfordert jedoch weitere Analysen verschiedener möglicher Mechanismen wie die Effekte von Neurotrophinen oder Dopamin-Feedbackinhibition.

Bei Betrachtung der dopaminergen Neurone in der SNpr zeigt sich ein deutlicher Läsionseffekt. Zudem konnten deutliche Tendenzen in Richtung eines neurorestaurativen Effekts gezeigt werden. Generell ist die SNpr hauptsächlich durch GABAerge Neurone charakterisiert und dementsprechend zeigt sich auch in dieser Arbeit eine sehr geringe Anzahl dopaminergener Zellen (Zhou et al. 2009). Jedoch ist bekannt, dass eine hohe Dichte von

Dopaminrezeptoren an GABAergen Neuronen der SNpr vorhanden ist und dopaminerge Neurone der SNpc Einfluss auf den Output der SNpr haben (Zhou et al. 2009). Vielleicht ist in diesem Zusammenhang auch eine gegenseitige Beeinflussung von SNpc und SNpr vorstellbar (Paul et al. 2004). Ein möglicher Einfluss der durch STN-THS stimulierten dopaminergen Neuronen in der SNpc auf die Neurone der SNpr sollte daher Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Auch hinsichtlich der Anzahl an dopaminergen Zellen im Bereich der VTA zeigt sich ein deutlicher Läsionseffekt, obgleich weniger stark ausgeprägt als in der SNpc. Entgegen einer vorangegangenen Studie von Fauser et al. konnte hier kein Effekt der STN-THS nachgewiesen werden (Fauser et al. 2021). Jedoch wurde in der Studie von Fauser et al. über einen deutlich längeren Zeitraum stimuliert, sodass eine langsamere Dynamik des neurorestaurativen Effektes der STN-THS nicht ausgeschlossen werden kann. Im Menschen ist die VTA ein Kerngebiet, das eng in die nicht-motorischen Symptome des IPS eingebunden ist (Oades et al. 1987). Besserungen der nicht-motorischen Symptome werden noch Wochen nach Beginn der THS bei IPS-Patienten beobachtet (Dafsari et al. 2016; Georgiev et al. 2021). Ein Effekt von STN-THS auf die VTA sollte somit in weiteren Studien geprüft werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit einen signifikanten, neurorestaurativen Effekt der STN-THS auf die dopaminergen Neurone im Bereich der SNpc. Da die Neuronengesamtzahl durch die STN-THS im Bereich der SNpc unbeeinflusst bleibt, handelt es sich bei dieser Neurorestoration am ehesten um einen direkten Einfluss der STN-THS auf Expression von TH. Wie diese Wirkung von STN-THS vermittelt wird, muss in weiteren Studien geklärt werden. Auch im Bereich der SNpr zeigen sich deutliche Tendenzen in Richtung eines neurorestaurativen Effekts, jedoch müssen in diesem Fall weitere Studien mit einer größeren Zahl an Versuchstieren folgen, um diese sicher zu belegen. Spannend wäre in diesem Fall auch eine zusätzliche Analyse der GABAergen Neurone. Für die VTA sind in Bezug auf die Dichte an dopaminergen Neuronen keine signifikanten Veränderungen erkennbar, was möglicherweise an der zu kurzen Stimulationsdauer liegt.

4.4 IST C-FOS EIN MARKER NEURONALER PLASTIZITÄT NACH CHRONISCHER THS?

Die Expression von *c-fos* im Zellkern beziehungsweise die *c-Fos*-Synthese um den Zellkern sind in der Literatur als klassischer Marker für neuronale Aktivität beschrieben (Richter et al. 2019; Schulte et al. 2006; Shehab et al. 2014). Aktuell existieren keine adäquaten Marker für neuronale Aktivierung oder neuronale Plastizität nach chronischer STN-THS. Ob *c-Fos* als Marker chronischer Zellaktivierung und neuronaler Plastizität dienen kann, wird in dieser Arbeit überprüft. Im Rahmen der immunhistochemischen Analysen von *c-Fos* zeigten sich zunächst verschiedene Muster des Markers: ein Mikroglia-assoziiertes, zytoplasmatisches Signal des *c-Fos* Markers, welches in dieser Arbeit als *c-Fos* Typ I beschrieben wird, ein nukleär lokalisiertes, heterogen-punktförmiges *c-Fos* Signal (*c-Fos* Typ II), sowie ein nukleär lokalisiertes, homogen-flächiges *c-Fos* Signal (*c-Fos* Typ III).

4.4.1 C-FOS TYP I – HETEROGENE C-FOS-ANLAGERUNG

Das zytoplasmatische Signal von *c-Fos* konnte in einer nachträglichen, separaten, indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit dem ionisierten Calcium-bindenden Adaptermolekül-1 (*Iba-1*) als Mikroglia-assoziiert eingeordnet werden (Cruz-Mendoza et al. 2022; Mendes-Pinheiro et al. 2021). Mikroglia sind neben Astrozyten und Oligoglia ein Hauptgliatyp des ZNS. Gliazellen machen neben Neuronen einen großen Teil der Zellen des ZNS aus (Jäkel et al. 2017). Mikroglia sind unter anderem in die Phagozytose apoptotischer Neurone eingebunden und ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems des ZNS sowie mitverantwortlich für die neuronale Plastizität (Subramaniam et al. 2017). Bei der Analyse des Mikroglia-assoziierten *c-Fos* Typ I zeigten sich in dieser Arbeit in keiner untersuchten Hirnregion signifikante Effekte der Läsion oder der STN-THS.

c-Fos ist als Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 eng in die Regulation von Zellen des Immunsystems eingebunden (Colotta et al. 1992). Nach akuten Hirnverletzungen, die eine erhöhte Aktivität des Immunsystems induzierten, konnte eine über sieben Tage andauernde Dichte *c-Fos*⁺ Zellen in der Ratte bereits durch Zheng et al. gezeigt werden (Zheng et al. 2014). *c-Fos* als Marker für Mikroglia-Aktivität wurde bereits durch Cruz-Mendoza et al. beschrieben, jedoch nur in der akuten Phase (Stunden) nach dem gesetzten Reiz (Cruz-Mendoza et al. 2022). Da Mikroglia in dieser Arbeit jedoch nur nachträglich durch eine zusätzliche Färbung nachgewiesen wurden, sollte *c-Fos* in jedem Fall in weiteren Studien als Marker für eine STN-THS vermittelte Wirkung auf die Glia-Aktivierung und die Aktivität des Immunsystems untersucht werden. Zusätzlich zu Mikroglia sollten in diesem Zusammenhang auch Astrozyten und Oligoglia weiter untersucht werden.

4.4.2 c-FOS TYP II – HETEROGENE c-FOS-ANLAGERUNG

Obwohl in dieser Arbeit nach siebentägiger STN-THS keine Zellen mit hoher c-Fos-Konzentration im Zellkern nachgewiesen werden konnten, wurden in der Immunhistochemie Neurone festgestellt, die spezifische Signale des c-Fos-Markers in einem nukleär lokalisierten, heterogen-punktförmigen Muster zeigten. Diese Neurone werden in dieser Arbeit c-Fos Typ II⁺ Neurone genannt. Ein basales, heterogenes Verteilungsmuster von c-Fos im Bereich des Zellkerns von Neuronen ohne vorherigen *Stimulus* wurde bereits durch Dragunow et al. beschrieben (Dragunow et al. 1988). Dieses heterogene Muster könnte eine basale, neuronale Aktivität widerspiegeln. In diesem Zusammenhang wäre eine zellkernnahe Verteilung des c-Fos-Proteins schlüssig, da es als Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 auch ohne vorherige exogene Stimuli unmittelbar in Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose eingebunden ist (Shaulian et al. 2001). Ein ähnliches, heterogenes Anlagerungsmuster von c-Fos zeigten auch Wada et al. im Mausmodell (Wada et al. 2005). Ähnlich wie in diesem Versuch wiesen auch in der Arbeit von Wada et al. hauptsächlich Neurone dieses heterogene c-Fos-Muster auf. Es ergab sich keine Kolo-kalisation mit dem Marker für Gliazellen. Jedoch untersuchten Wada et al. Zellen, die positiv für *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) waren, also Astrozyten und keine Mikroglia.

In der hier vorgestellten Arbeit bewirkte die Läsion eine Reduktion der Dichte an c-Fos Typ II⁺ Neuronen und dopaminergen c-Fos Typ II⁺ Neuronen im Bereich der SNpc, VTA und SNpr. Dies scheint nachvollziehbar, da die Läsion in dieser Arbeit insgesamt zu einer Degeneration der dopaminergen Neurone führte. Ein Effekt der STN-THS auf die basale neuronale Aktivität zeigte sich in keinem der untersuchten Kerngebiete.

4.4.3 c-FOS TYP III – HOMOGENE c-FOS-ANLAGERUNG

Das nukleär lokalisierte, homogen-flächige Muster, welches in dieser Arbeit als c-Fos Typ III beschrieben wird, ist in der aktuellen Fachliteratur die klassische c-Fos⁺ Zelle (Barros et al. 2015; Morgan et al. 1987; Richter et al. 2019). In dieser Arbeit konnten in keinem Kerngebiet der STN_{STIM}- und der STN_{SHAM}-Gruppe Zellen mit diesem Muster nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten Pflüger et al. flächig c-Fos⁺ Zellen nach siebentägiger Stimulation. Jedoch wurde in der Arbeit von Pflüger et al. nur das unmittelbar stimulierte Kerngebiet, das dorsolaterale *Striatum*, untersucht. Nachgeschaltete Kerngebiete wurden nicht betrachtet. Im dorsolateralen *Striatum* zeigten sich die flächigen c-Fos⁺ Zellen nur in unmittelbarer Umgebung zur Elektrode und nicht im gesamten dorsolateralen *Striatum*. In diesem Bereich unmittelbar um die Elektrode war die Gliazell-dichte deutlich erhöht. Es ist somit möglich, dass

die flächigen c-Fos⁺ Zellen in der Arbeit von Pflüger et al. Zeichen einer Aktivierung des Immunsystems sind oder Apoptosevorgängen entsprachen. Eine solche *foreign body reaction* wurde bereits durch Evers et al. beschrieben (Evers et al. 2022). Die Ergebnisse der Arbeit von Pflüger et al. stehen somit nicht im Widerspruch zu den hier dargelegten Resultaten, denn Pflüger et al. konnten nach siebentägiger Stimulation des dorsolateralen *Striatum* lediglich in der unmittelbaren Umgebung der Elektrode flächige c-Fos⁺ Neurone (c-Fos Typ III) feststellen, jedoch keine Stimulations-abhängigen Unterschiede nachweisen (Pflüger et al. 2019). Trotzdem wurde zur zusätzlichen Validierung des Versuchsmodells und der Immunhistochemie dieser Arbeit nachträglich eine vierstündig stimulierte Versuchsgruppe, die STN_{STIM4h}-Gruppe, ausgewertet. Diese Auswertung sollte sicherstellen, dass c-Fos Typ III⁺ Zellen im Versuchsaufbau dieser Arbeit nachgewiesen werden können. In dieser STN_{STIM4h}-Gruppe konnten in allen untersuchten Kerngebieten flächig-homogene c-Fos⁺ Zellen (c-Fos Typ III⁺ Zellen) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind im Kapitel 7.1 aufgelistet.

Zusammenfassend zeigten sich nach einer siebentägigen STN-THS keine c-Fos Typ III⁺ Zellen. Dieses Ergebnis war zu erwarten und entspricht früheren Arbeiten zur c-Fos-Kinetik in denen c-Fos nicht länger als sechs Stunden nach Setzung des *Stimulus* erhöht war (Barros et al. 2015; Morgan et al. 1987). Das klassische c-Fos-Muster scheint somit als Marker für neuronale Plastizität nach einem chronischen *Stimulus*, wie der STN-THS, ungeeignet zu sein. Jedoch zeigt diese Arbeit mit den c-Fos Typ I⁺ Zellen und c-Fos Typ II⁺ Zellen interessante neue Zellpopulationen. Diese sollten insbesondere in Bezug auf die Gliazellen in weiteren Arbeiten betrachtet werden, da c-Fos möglicherweise als Marker für die Aktivität des Immunsystems von Bedeutung ist.

4.5 LIMITATIONEN

Im Rahmen der vorgelegten Studie müssen auch Limitationen des Versuchs besprochen werden. Eine Limitation des Versuchs ist die geringe Zahl an Versuchstieren. So lag die Gruppenstärke in der STN_{STIM}- und STN_{SHAM}-Gruppe bei vier Versuchstieren. Die geringe Zahl ist auf den Verlust von Tieren durch nicht ausreichende Läsion nach 6-OHDA-Gabe mit kleiner drei Rotationen pro Minute im Apomorphin-induzierten Rotationsverhaltenstest oder technische Defekte des Stimulationssystems, wie beispielsweise Ausfälle durch Kabelbrüche, zurückzuführen. Durch eine optimale Zusammensetzung der Gruppen nach dem Ergebnis im Apomorphin-induzierten Rotationsverhaltenstest wurde versucht, dieser geringen Versuchstierzahl entgegenzuwirken. Trotz dieser Bemühungen resultierten aus der geringen Gruppenstärke hohe SEM-Werte, ein Verlust an signifikanten Informationen kann somit nicht völlig ausgeschlossen werden. Zudem korreliert die Zahl an Rotationen im Apomorphin-induzierten Rotationsverhaltenstest mit dem Zellverlust im Bereich der SNpc, nicht jedoch mit der VTA (Badstuebner et al. 2017). Dadurch ist es aktuell nicht möglich, eine sichere Läsionskontrolle im Bereich der VTA durchzuführen.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle könnte die Verwendung von Ketamin als Anästhetikum im Versuch sein. Bereits frühere Studien konnten zeigen, dass Ketamin einen stimulierenden Einfluss auf die *c-fos*-Expression hat und zudem die Freisetzung von Dopamin induzieren kann (Kokkinou et al. 2018; Nakao et al. 2003). Dahingehend wurden jedoch beide Versuchsgruppen gleichbehandelt und auch gleichhäufig operiert. Mögliche Einflüsse von Ketamin sollten somit in allen Versuchsgruppen gleichartig auftreten und somit keinen relevanten Effekt auf die Ergebnisse ausüben.

Zwischen Elektrodenimplantation und Stimulationsbeginn wurde eine Zeitspanne von sieben Tagen eingehalten, um eine suffiziente Einheilung der Elektroden zu gewährleisten (Badstuebner et al. 2017). Die einseitige Elektrodenimplantation in diesem Versuchsmodell bot die Möglichkeit, die stimulierte mit der nicht-stimulierten Hemisphäre zu vergleichen (Badstuebner et al. 2017). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass auch eine einseitige Stimulation Auswirkungen auf die nicht-stimulierte Hemisphäre haben kann (Apetz et al. 2019; Walker et al. 2009). Aus diesem Grund fungierten läsionierte, aber nicht-stimulierte Versuchstiere als Kontrollgruppe. Denkbare bilaterale Effekte der unilateralen STN-THS konnten so ebenfalls bewertet werden.

Letztendlich sind Tierversuche zur THS mittels 6-OHDA-Modell der Ratte sehr zeit- und ressourcenaufwendig, bieten jedoch die Möglichkeit, chronische Krankheiten wie das IPS im

DISKUSSION

komplexen neuronalen System des Rattengehirns zu untersuchen und ein besseres Verständnis von Therapiemethoden wie der THS zu erlangen. Unter Abwägung des entstehenden Leidens der Versuchstiere sollte ein möglicher Erkenntnisgewinn, der für bessere Therapiemöglichkeiten von Patienten mit IPS essentiell ist, im Vordergrund stehen.

4.6 FAZIT UND SCHLUSSWORT

Diese Arbeit zeigt eine Zunahme dopaminergener Neurone im Bereich der SNpc bereits nach siebentägiger unilateraler STN-THS im 6-OHDA-Modell der Ratte und somit einen neurorestorativen Effekt dieses Therapieverfahrens. Dies zeigt einen stimulierenden Einfluss von STN-THS auf die neuronale Plastizität des dopaminergen Systems. Es gelang hingegen nicht, c-Fos als Marker einer chronischen, neuronalen Aktivierung und neuronaler Plastizität unter STN-THS in diesem Modell zu etablieren. Es zeigten sich jedoch verschiedene sowohl neuronale als auch Mikroglia-assoziierte c-Fos-Muster. Dies ermöglichte ein genaueres Zellbezogenes Verständnis von c-Fos und gibt Anhalt dafür, dass c-Fos als wertvoller Marker für die Aktivität des Immunsystems im ZNS dienen könnte.

Wie ich einleitend beschrieben habe, ist das IPS eine unheilbare, über Jahrzehnte fortschreitende Erkrankung, deren Endpunkt häufig die schwere Pflegebedürftigkeit des Betroffenen ist. Eine langfristige effektive Therapie erhält dem Erkrankten und seinen Mitmenschen über Jahrzehnte die soziale Teilhabe und Selbstständigkeit. Dies bedeutet eine maßgebliche Verbesserung von Lebensqualität. In einer älter werdenden Gesellschaft ist mit einer weiteren Zunahme der Prävalenz der Erkrankung zu rechnen, sodass langfristig effektive Therapiemethoden, wie die THS, gefunden und optimiert werden müssen.

V. THESEN

1. Der *Nucleus subthalamicus* ist als Stimulationstarget einer unilateralen Tiefen Hirnstimulation geeignet, um das dopaminerge System im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte zu beeinflussen.
2. Eine siebentägige Stimulationsdauer ist geeignet, um Änderungen im dopaminergen System durch eine unilaterale Tiefe Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte hervorzurufen.
3. Eine siebentägige, unilaterale Tiefe Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* beeinflusst signifikant die Zahl dopaminergener Neurone im dopaminergen System der *Substantia nigra pars compacta* im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte.
4. Nach einer siebentägigen, unilateralen Tiefen Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* zeigt sich eine Diskrepanz zwischen neuronaler Gesamtzahl und der Zahl dopaminergener Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte.
5. Eine Diskrepanz zwischen neuronaler Gesamtzahl und der Zahl dopaminergener Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* nach einer siebentägigen, unilateralen Tiefen Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte ist Ausdruck einer Stimulation der neuronalen Plastizität auf zellulärer Ebene.
6. Eine mögliche Beeinflussung der Tyrosinhydroxylase bietet eine Erklärung für die Beeinflussung der dopaminergen, neuronalen Plastizität auf zellulärer Ebene nach einer siebentägigen, unilateralen Tiefen Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte.
7. Eine siebentägige, unilaterale Tiefe Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* zeigt in diesem Versuch keine signifikanten Veränderungen der Zahl dopaminergener Neurone im dopaminergen System der *Substantia nigra pars reticulata* und *Area tegmentalis ventralis* im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte.

8. Das *Immediate early gen* c-Fos lässt sich nach siebentägiger, unilateraler Tiefen Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte in verschiedene Ausprägungsmuster gliedern.
9. Das *Immediate early gen* c-Fos ist in seiner flächig homogenen Ausprägung als funktioneller Biomarker für neuronale Plastizität in der *Substantia nigra pars compacta*, *Substantia nigra pars reticulata* und *Area tegmentalis ventralis* im Rahmen einer siebentägigen, unilateralen Tiefen Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell nicht geeignet.
10. Nach einer siebentägigen, unilateralen Tiefen Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte zeigt sich das *Immediate early gen* c-Fos nicht nur in Neuronen, sondern auch in anderen Zellen des zentralen Nervensystems.
11. Im Rahmen einer Stimulation der neuronalen Plastizität durch siebentägige, unilaterale Tiefe Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte spielen auch anderen Zellen des Zentralen Nervensystems eine Rolle.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberico, S. L., M. D. Cassell, and N. S. Narayanan. 2015. The Vulnerable Ventral Tegmental Area in Parkinson's Disease. *Basal Ganglia* 5 (2-3):51-55.
- Andreska, T., P. Lüningschrör, and M. Sendtner. 2020. Regulation of TrkB cell surface expression—a mechanism for modulation of neuronal responsiveness to brain-derived neurotrophic factor. *Cell Tissue Res* 382 (1):5-14.
- Apetz, N., E. Kordys, M. Simon, B. Mang, M. Aswendt, D. Wiedermann, B. Neumaier, A. Drzezga, L. Timmermann, and H. Endepols. 2019. Effects of subthalamic deep brain stimulation on striatal metabolic connectivity in a rat hemiparkinsonian model. *Dis Model Mech* 12 (5).
- Armstrong, M. J., and M. S. Okun. 2020. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *Jama* 323 (6):548-560.
- Arnold, C. E., A. M. Rajniecek, J. I. Hoare, S. M. Pokharel, C. D. McCaig, R. N. Barker, and H. M. Wilson. 2019. Physiological strength electric fields modulate human T cell activation and polarisation. *Sci Rep* 9 (1):17604.
- Bäckström, D., G. Granåsen, M. E. Domellöf, J. Linder, S. Jakobson Mo, K. Riklund, H. Zetterberg, K. Blennow, and L. Forsgren. 2018. Early predictors of mortality in parkinsonism and Parkinson disease: A population-based study. *Neurology* 91 (22):e2045-e2056.
- Badstuebner, K., U. Gimsa, I. Weber, A. Tuchscherer, and J. Gimsa. 2017. Deep Brain Stimulation of Hemiparkinsonian Rats with Unipolar and Bipolar Electrodes for up to 6 Weeks: Behavioral Testing of Freely Moving Animals. *Parkinsons Dis* 2017:5693589.
- Bandmann, O., K. H. Weiss, and S. G. Kaler. 2015. Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol* 14 (1):103-113.
- Barros, V. N., M. Mundim, L. T. Galindo, S. Bittencourt, M. Porcionatto, and L. E. Mello. 2015. The pattern of c-Fos expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys. *Front Cell Neurosci* 9:72.
- Baydyuk, M., M. T. Nguyen, and B. Xu. 2011. Chronic deprivation of TrkB signaling leads to selective late-onset nigrostriatal dopaminergic degeneration. *Exp Neurol* 228 (1):118-125.
- Benazzouz, A., B. Piallat, P. Pollak, and A. L. Benabid. 1995. Responses of substantia nigra pars reticulata and globus pallidus complex to high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats: electrophysiological data. *Neurosci Lett* 189 (2):77-80.
- Bjornestad, A., O. B. Tysnes, J. P. Larsen, and G. Alves. 2016. Loss of independence in early Parkinson disease: A 5-year population-based incident cohort study. *Neurology* 87 (15):1599-1606.
- Braak, H., K. Del Tredici, U. Rüb, R. A. de Vos, E. N. Jansen Steur, and E. Braak. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24 (2):197-211.
- Breit, S., A. Martin, L. Lessmann, D. Cerkez, T. Gasser, and J. B. Schulz. 2008. Bilateral changes in neuronal activity of the basal ganglia in the unilateral 6-hydroxydopamine rat model. *J Neurosci Res* 86 (6):1388-1396.
- Burré, J. 2015. The Synaptic Function of α -Synuclein. *J Parkinsons Dis* 5 (4):699-713.
- Caligiore, D., R. C. Helmich, M. Hallett, A. A. Moustafa, L. Timmermann, I. Toni, and G. Baldassarre. 2016. Parkinson's disease as a system-level disorder. *NPJ Parkinsons Dis* 2:16025.
- Calvo, A. C., A. L. Pey, A. Miranda-Vizuete, A. P. Døskeland, and A. Martinez. 2011. Divergence in enzyme regulation between *Caenorhabditis elegans* and human tyrosine hydroxylase, the key enzyme in the synthesis of dopamine. *Biochem J* 434 (1):133-141.

- Carbone, F., A. Djamshidian, K. Seppi, and W. Poewe. 2019. Apomorphine for Parkinson's Disease: Efficacy and Safety of Current and New Formulations. *CNS Drugs* 33 (9):905-918.
- Chen, Y., G. Zhu, D. Liu, X. Zhang, Y. Liu, T. Yuan, T. Du, and J. Zhang. 2020. Subthalamic nucleus deep brain stimulation suppresses neuroinflammation by Fractalkine pathway in Parkinson's disease rat model. *Brain Behav Immun* 90:16-25.
- Collier, T. J., N. M. Kanaan, and J. H. Kordower. 2011. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. *Nat Rev Neurosci* 12 (6):359-366.
- Colotta, F., N. Polentarutti, M. Sironi, and A. Mantovani. 1992. Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J Biol Chem* 267 (26):18278-18283.
- Couceyro, P., K. M. Pollock, K. Drews, and J. Douglass. 1994. Cocaine differentially regulates activator protein-1 mRNA levels and DNA-binding complexes in the rat striatum and cerebellum. *Mol Pharmacol* 46 (4):667-676.
- Cramer, S. C., M. Sur, B. H. Dobkin, C. O'Brien, T. D. Sanger, J. Q. Trojanowski, J. M. Rumsey, R. Hicks, J. Cameron, D. Chen, W. G. Chen, L. G. Cohen, C. deCharms, C. J. Duffy, G. F. Eden, E. E. Fetz, R. Filart, M. Freund, S. J. Grant, S. Haber, P. W. Kalivas, B. Kolb, A. F. Kramer, M. Lynch, H. S. Mayberg, P. S. McQuillen, R. Nitkin, A. Pascual-Leone, P. Reuter-Lorenz, N. Schiff, A. Sharma, L. Shekim, M. Stryker, E. V. Sullivan, and S. Vinogradov. 2011. Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain* 134 (Pt 6):1591-1609.
- Cruz-Mendoza, F., F. Jauregui-Huerta, A. Aguilar-Delgadillo, J. García-Estrada, and S. Luquin. 2022. Immediate Early Gene c-fos in the Brain: Focus on Glial Cells. *Brain Sci* 12 (6).
- Curran, T., G. Peters, C. Van Beveren, N. M. Teich, and I. M. Verma. 1982. FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J Virol* 44 (2):674-682.
- da Silva, J. C., F. A. Scorza, M. B. Nejm, E. A. Cavalheiro, and A. Cukiert. 2014. c-FOS expression after hippocampal deep brain stimulation in normal rats. *Neuromodulation* 17 (3):213-217; discussion 216-217.
- Dafsari, H. S., P. Reddy, C. Herchenbach, S. Wawro, J. N. Petry-Schmelzer, V. Visser-Vandewalle, A. Rizos, M. Silverdale, K. Ashkan, M. Samuel, J. Evans, C. A. Huber, G. R. Fink, A. Antonini, K. R. Chaudhuri, P. Martinez-Martin, and L. Timmermann. 2016. Beneficial Effects of Bilateral Subthalamic Stimulation on Non-Motor Symptoms in Parkinson's Disease. *Brain Stimul* 9 (1):78-85.
- Dahlstroem, A., and K. Fuxe. 1964. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiol Scand Suppl*:Suppl 232:231-255.
- Dauer, W., and S. Przedborski. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39 (6):889-909.
- Deuschländer, A. B., O. A. Ross, D. W. Dickson, and Z. K. Wszolek. 2018. Atypical parkinsonian syndromes: a general neurologist's perspective. *Eur J Neurol* 25 (1):41-58.
- Dias, V., E. Junn, and M. M. Mouradian. 2013. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 3 (4):461-491.
- Domingos, J., S. H. J. Keus, J. Dean, N. M. de Vries, J. J. Ferreira, and B. R. Bloem. 2018. The European Physiotherapy Guideline for Parkinson's Disease: Implications for Neurologists. *J Parkinsons Dis* 8 (4):499-502.
- Dorsey, E. E., A.; Nichols E., Abbasi N.; Abd-Allah F.; Abdelalim A.; Adsuar J.; Geleto Ansha M.; Brayne C.; Choi J.; Collado-Mateo D.; Dahodwala N.; Murray C. 2018. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 17 (11):939-953.

- Dragunow, M., and H. A. Robertson. 1988. Localization and induction of c-fos protein-like immunoreactive material in the nuclei of adult mammalian neurons. *Brain Res* 440 (2):252-260.
- Evers, J., K. Sridhar, J. Liegey, J. Brady, H. Jahns, and M. Lowery. 2022. Stimulation-induced changes at the electrode-tissue interface and their influence on deep brain stimulation. *J Neural Eng* 19 (4).
- Fauser, M., U. Naumann, M. Statz, M. Kober, K. Badstübner-Meeske, and A. Storch. 2023. Chronic deep brain stimulation in the subthalamic nucleus, but not in the entopeduncular nucleus increases neurogenesis in the olfactory bulb, but does not influence hippocampal neurogenesis in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation* 16 (1):315.
- Fauser, M., M. Ricken, F. Markert, N. Weis, O. Schmitt, J. Gimsa, C. Winter, K. Badstübner-Meeske, and A. Storch. 2021. Subthalamic nucleus deep brain stimulation induces sustained neurorestoration in the mesolimbic dopaminergic system in a Parkinson's disease model. *Neurobiol Dis* 156:105404.
- Faust, K., P. Vajkoczy, B. Xi, and D. Harnack. 2021. The Effects of Deep Brain Stimulation of the Subthalamic Nucleus on Vascular Endothelial Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor, and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Stereotact Funct Neurosurg* 99 (3):256-266.
- Fenoy, A. J., L. Goetz, S. Chabardès, and Y. Xia. 2014. Deep brain stimulation: are astrocytes a key driver behind the scene? *CNS Neurosci Ther* 20 (3):191-201.
- Fernandez, H. H., J. T. Boyd, V. S. C. Fung, M. F. Lew, R. L. Rodriguez, J. T. Slevin, D. G. Standaert, C. Zadikoff, A. D. Vanagunas, K. Chatamra, S. Eaton, M. F. Facheris, C. Hall, W. Z. Robieson, J. Benesh, and A. J. Espay. 2018. Long-term safety and efficacy of levodopa-carbidopa intestinal gel in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord* 33 (6):928-936.
- Finkbeiner, S., S. F. Tavazoie, A. Maloratsky, K. M. Jacobs, K. M. Harris, and M. E. Greenberg. 1997. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19 (5):1031-1047.
- Fischer, D. L., T. J. Collier, A. Cole-Strauss, S. L. Wohlgenant, J. W. Lipton, K. Steece-Collier, F. P. Manfredsson, C. J. Kemp, and C. E. Sortwell. 2015. High-Frequency Stimulation of the Rat Entopeduncular Nucleus Does Not Provide Functional or Morphological Neuroprotection from 6-Hydroxydopamine. *PLoS One* 10 (7):e0133957.
- Fischer, D. L., C. J. Kemp, A. Cole-Strauss, N. K. Polinski, K. L. Paumier, J. W. Lipton, K. Steece-Collier, T. J. Collier, D. J. Buhlinger, and C. E. Sortwell. 2017. Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation Employs trkB Signaling for Neuroprotection and Functional Restoration. *J Neurosci* 37 (28):6786-6796.
- Frielingdorf, H., K. Schwarz, P. Brundin, and P. Mohapel. 2004. No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (27):10177-10182.
- Fukuchi, M., H. Fujii, H. Takachi, H. Ichinose, Y. Kuwana, A. Tabuchi, and M. Tsuda. 2010. Activation of tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its selective inhibition through Ca(2+) signals evoked via the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *Brain Res* 1366:18-26.
- Furlanetti, L. L., J. G. Cordeiro, K. K. Cordeiro, J. A. García, C. Winkler, G. A. Lepski, V. A. Coenen, G. Nikkhah, and M. D. Döbrössy. 2015. Continuous High-Frequency Stimulation of the Subthalamic Nucleus Improves Cell Survival and Functional Recovery Following Dopaminergic Cell Transplantation in Rodents. *Neurorehabil Neural Repair* 29 (10):1001-1012.
- Gallo, F. T., C. Katche, J. F. Morici, J. H. Medina, and N. V. Weisstaub. 2018. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Front Behav Neurosci* 12:79.
- Gardner, J. 2013. A history of deep brain stimulation: Technological innovation and the role of clinical assessment tools. *Soc Stud Sci* 43 (5):707-728.
-

- Gass, P., T. Herdegen, R. Bravo, and M. Kiessling. 1992. Induction of immediate early gene encoded proteins in the rat hippocampus after bicuculline-induced seizures: differential expression of KROX-24, FOS and JUN proteins. *Neuroscience* 48 (2):315-324.
- Georgiev, D., M. Mencinger, R. Rajnar, P. Mušič, M. Benedičič, D. Flisar, R. Bošnjak, J. Mehrkens, Z. Pirtošek, K. Boetzel, and M. Trošt. 2021. Long-term effect of bilateral STN-DBS on non-motor symptoms in Parkinson's disease: A four-year observational, prospective study. *Parkinsonism Relat Disord* 89:13-16.
- Gerfen, C. R., T. M. Engber, L. C. Mahan, Z. Susel, T. N. Chase, F. J. Monsma, Jr., and D. R. Sibley. 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250 (4986):1429-1432.
- Gould, E. 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8 (6):481-488.
- Grembecka, B., W. Glac, M. Listowska, G. Jerzemowska, K. Plucińska, I. Majkutewicz, P. Badtke, and D. Wrona. 2021. Subthalamic Deep Brain Stimulation Affects Plasma Corticosterone Concentration and Peripheral Immunity Changes in Rat Model of Parkinson's Disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 16 (2):454-469.
- Gusel'nikova, V. V., and D. E. Korzhevskiy. 2015. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae* 7 (2):42-47.
- Haavik, J., and K. Toska. 1998. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 16 (3):285-309.
- Hacke, W. 2016. *Neurologie*. Vol. 14. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Haddad, F., M. Sawalha, Y. Khawaja, A. Najjar, and R. Karaman. 2017. Dopamine and Levodopa Prodrugs for the Treatment of Parkinson's Disease. *Molecules* 23 (1).
- Hanna, J. A., T. Scullen, L. Kahn, M. Mathkour, E. E. Gouveia, J. Garces, L. M. Evans, G. Lea, D. J. Houghton, E. Biro, C. J. Bui, O. A. Sulaiman, and R. D. Smith. 2018. Comparison of elderly and young patient populations treated with deep brain stimulation for Parkinson's disease: long-term outcomes with up to 7 years of follow-up. *J Neurosurg* 131 (3):807-812.
- He, Z., Y. Jiang, H. Xu, H. Jiang, W. Jia, P. Sun, and J. Xie. 2014. High frequency stimulation of subthalamic nucleus results in behavioral recovery by increasing striatal dopamine release in 6-hydroxydopamine lesioned rat. *Behav Brain Res* 263:108-114.
- Healy-Stoffel, M., S. Omar Ahmad, J. A. Stanford, and B. Levant. 2014. Differential effects of intrastriatal 6-hydroxydopamine on cell number and morphology in midbrain dopaminergic subregions of the rat. *Brain Res* 1574:113-119.
- Hefti, F., E. Melamed, and R. J. Wurtman. 1980. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res* 195 (1):123-137.
- Helf, C., M. Kober, F. Markert, J. Lanto, L. Overhoff, K. Badstübner-Meeske, A. Storch, and M. Fauser. 2023. Subthalamic nucleus deep brain stimulation induces nigrostriatal dopaminergic plasticity in a stable rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* 34 (10):506-511.
- Henning, J., U. Strauss, A. Wree, J. Gimsa, A. Rolfs, R. Benecke, and U. Gimsa. 2008. Differential astroglial activation in 6-hydroxydopamine models of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 62 (4):246-253.
- Hirshler, Y. K., U. Polat, and A. Biegon. 2010. Intracranial electrode implantation produces regional neuroinflammation and memory deficits in rats. *Exp Neurol* 222 (1):42-50.
- Hoehn, M. M., and M. D. Yahr. 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17 (5):427-442.
- Höglinger G., T. C. e. a. 2023. Parkinson-Krankheit, S2k-Leitlinie. *Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 13.01.2024).
- Hudson, J. L., C. G. van Horne, I. Strömberg, S. Brock, J. Clayton, J. Masserano, B. J. Hoffer, and G. A. Gerhardt. 1993. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626 (1-2):167-174.
-

- Hughes, A. J., S. E. Daniel, L. Kilford, and A. J. Lees. 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55 (3):181-184.
- Jäkel, S., and L. Dimou. 2017. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci* 11:24.
- Jollivet, C., C. N. Montero-Menei, M. C. Venier-Julienne, A. Sapin, J. P. Benoit, and P. Menei. 2004. Striatal tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons are induced by L-dihydroxyphenylalanine and nerve growth factor treatment in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neurosci Lett* 362 (2):79-82.
- Kalia, L. V., and A. E. Lang. 2015. Parkinson's disease. *Lancet* 386 (9996):896-912.
- Karl, A. 2019. Einfluss von 6-OHDA auf die Expression Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen im Nager Striatum in vivo und vitro, edited by M. F. t. d. E. K. U. t. z. Tübingen. <http://dx.doi.org/10.15496/publikation-30234>, 66 Seiten.
- Katzenschlager, R., W. Poewe, O. Rascol, C. Trenkwalder, G. Deuschl, K. R. Chaudhuri, T. Henriksen, T. van Laar, K. Spivey, S. Vel, H. Staines, and A. Lees. 2018. Apomorphine subcutaneous infusion in patients with Parkinson's disease with persistent motor fluctuations (TOLEDO): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 17 (9):749-759.
- Keeler, J. F., D. O. Pretsell, and T. W. Robbins. 2014. Functional implications of dopamine D1 vs. D2 receptors: A 'prepare and select' model of the striatal direct vs. indirect pathways. *Neuroscience* 282:156-175.
- Kim, K. S., D. H. Park, T. C. Wessel, B. Song, J. A. Wagner, and T. H. Joh. 1993. A dual role for the cAMP-dependent protein kinase in tyrosine hydroxylase gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (8):3471-3475.
- Kirik, D., C. Rosenblad, and A. Björklund. 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* 152 (2):259-277.
- Kokkinou, M., A. H. Ashok, and O. D. Howes. 2018. The effects of ketamine on dopaminergic function: meta-analysis and review of the implications for neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 23 (1):59-69.
- Krause, P., J. Reimer, J. Kaplan, F. Borngräber, G. H. Schneider, K. Faust, and A. A. Kühn. 2022. Deep brain stimulation in Early Onset Parkinson's disease. *Front Neurol* 13:1041449.
- Lanciego, J. L., N. Luquin, and J. A. Obeso. 2012. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (12):a009621.
- Langston, J. W., P. Ballard, J. W. Tetrad, and I. Irwin. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219 (4587):979-980.
- Lee, K. H., C. D. Blaha, B. T. Harris, S. Cooper, F. L. Hitti, J. C. Leiter, D. W. Roberts, and U. Kim. 2006. Dopamine efflux in the rat striatum evoked by electrical stimulation of the subthalamic nucleus: potential mechanism of action in Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 23 (4):1005-1014.
- Levin, J., A. Kurz, T. Arzberger, A. Giese, and G. U. Höglinger. 2016. The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. *Dtsch Arztebl Int* 113 (5):61-69.
- Lin, P. Y., E. T. Kavalali, and L. M. Monteggia. 2018. Genetic Dissection of Presynaptic and Postsynaptic BDNF-TrkB Signaling in Synaptic Efficacy of CA3-CA1 Synapses. *Cell Rep* 24 (6):1550-1561.
- Lindgren, N., Z. Q. Xu, M. Herrera-Marschitz, J. Haycock, T. Hökfelt, and G. Fisone. 2001. Dopamine D(2) receptors regulate tyrosine hydroxylase activity and phosphorylation at Ser40 in rat striatum. *Eur J Neurosci* 13 (4):773-780.
- Litvan, I., K. P. Bhatia, D. J. Burn, C. G. Goetz, A. E. Lang, I. McKeith, N. Quinn, K. D. Sethi, C. Shults, and G. K. Wenning. 2003. Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Mov Disord* 18 (5):467-486.

- Machhi, J., B. D. Kevadiya, I. K. Muhammad, J. Herskovitz, K. E. Olson, R. L. Mosley, and H. E. Gendelman. 2020. Harnessing regulatory T cell neuroprotective activities for treatment of neurodegenerative disorders. *Mol Neurodegener* 15 (1):32.
- Maesawa, S., Y. Kaneoke, Y. Kajita, N. Usui, N. Misawa, A. Nakayama, and J. Yoshida. 2004. Long-term stimulation of the subthalamic nucleus in hemiparkinsonian rats: neuroprotection of dopaminergic neurons. *J Neurosurg* 100 (4):679-687.
- Masini, D., C. Plewnia, M. Bertho, N. Scalbert, V. Caggiano, and G. Fisone. 2021. A Guide to the Generation of a 6-Hydroxydopamine Mouse Model of Parkinson's Disease for the Study of Non-Motor Symptoms. *Biomedicines* 9 (6).
- McKinnon, C., P. Gros, D. J. Lee, C. Hamani, A. M. Lozano, L. V. Kalia, and S. K. Kalia. 2019. Deep brain stimulation: potential for neuroprotection. *Ann Clin Transl Neurol* 6 (1):174-185.
- Mendes-Pinheiro, B., C. Soares-Cunha, A. Marote, E. Loureiro-Campos, J. Campos, S. Barata-Antunes, D. Monteiro-Fernandes, D. Santos, S. Duarte-Silva, L. Pinto, and A. José Salgado. 2021. Unilateral Intrastratial 6-Hydroxydopamine Lesion in Mice: A Closer Look into Non-Motor Phenotype and Glial Response. *Int J Mol Sci* 22 (21).
- Metz, G. A., A. Tse, M. Ballermann, L. K. Smith, and K. Fouad. 2005. The unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson's disease revisited: an electromyographic and behavioural analysis. *Eur J Neurosci* 22 (3):735-744.
- Miller, K. M., J. R. Patterson, J. Kochmanski, C. J. Kemp, A. C. Stoll, C. U. Onyekpe, A. Cole-Strauss, K. Steece-Collier, J. W. Howe, K. C. Luk, and C. E. Sortwell. 2021. Striatal Afferent BDNF Is Disrupted by Synucleinopathy and Partially Restored by STN DBS. *J Neurosci* 41 (9):2039-2052.
- Morgan, J. I., D. R. Cohen, J. L. Hempstead, and T. Curran. 1987. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237 (4811):192-197.
- Moro, E., M. Scerrati, L. M. Romito, R. Roselli, P. Tonali, and A. Albanese. 1999. Chronic subthalamic nucleus stimulation reduces medication requirements in Parkinson's disease. *Neurology* 53 (1):85-90.
- Nakao, S., A. Nagata, E. Miyamoto, M. Masuzawa, T. Murayama, and K. Shingu. 2003. Inhibitory effect of propofol on ketamine-induced c-Fos expression in the rat posterior cingulate and retrosplenial cortices is mediated by GABAA receptor activation. *Acta Anaesthesiol Scand* 47 (3):284-290.
- Nerius, M., A. Fink, and G. Doblhammer. 2017. Parkinson's disease in Germany: prevalence and incidence based on health claims data. *Acta Neurol Scand* 136 (5):386-392.
- Oades, R. D., and G. M. Halliday. 1987. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434 (2):117-165.
- Park, S. Y., H. Yang, M. Ye, X. Liu, I. Shim, Y. T. Chang, and H. Bae. 2022. Neuroprotective effects of ex vivo-expanded regulatory T cells on trimethyltin-induced neurodegeneration in mice. *J Neuroinflammation* 19 (1):143.
- Parkinson, J. 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14 (2):223-236; discussion 222.
- Paul G, Meissner W, Rein S, Harnack D, Winter C, Hosmann K, Morgenstern R, Kupsch A. Ablation of the subthalamic nucleus protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2004 Feb;185(2):272-80.
- Paxinos, G., and W. C. 2006. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego.
- Pflüger, P., R. C. Pinnell, N. Martini, and U. G. Hofmann. 2019. Chronically Implanted Microelectrodes Cause c-fos Expression Along Their Trajectory. *Front Neurosci* 13:1367.
- Pinheiro Campos, A. C., R. C. R. Martinez, A. V. V. Auada, I. Lebrun, E. T. Fonoff, C. Hamani, and R. L. Pagano. 2022. Effect of Subthalamic Stimulation and Electrode Implantation in the Striatal Microenvironment in a Parkinson's Disease Rat Model. *Int J Mol Sci* 23 (20).
- Pringsheim, T., N. Jette, A. Frolkis, and T. D. Steeves. 2014. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 29 (13):1583-1590.
- Rakic, P. 2002. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22 (3):614-618.
-

- Ramasubbu, R., S. Lang, and Z. H. T. Kiss. 2018. Dosing of Electrical Parameters in Deep Brain Stimulation (DBS) for Intractable Depression: A Review of Clinical Studies. *Front Psychiatry* 9:302.
- Ramig, L., A. Halpern, J. Spielman, C. Fox, and K. Freeman. 2018. Speech treatment in Parkinson's disease: Randomized controlled trial (RCT). *Mov Disord* 33 (11):1777-1791.
- Rentsch, P., S. Stayte, G. P. Morris, and B. Vissel. 2019. Time dependent degeneration of the nigrostriatal tract in mice with 6-OHDA lesioned medial forebrain bundle and the effect of activin A on L-Dopa induced dyskinesia. *BMC Neurosci* 20 (1):5.
- Richter, F., A. Bauer, S. Perl, A. Schulz, and A. Richter. 2019. Optogenetic augmentation of the hypercholinergic endophenotype in DYT1 knock-in mice induced erratic hyperactive movements but not dystonia. *EBioMedicine* 41:649-658.
- Rocca, W. A. 2018. The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective. *Lancet Neurol* 17 (11):928-929.
- Rodriguez-Oroz, M. C., J. A. Obeso, A. E. Lang, J. L. Houeto, P. Pollak, S. Rehncrona, J. Kulisevsky, A. Albanese, J. Volkmann, M. I. Hariz, N. P. Quinn, J. D. Speelman, J. Guridi, I. Zamarbide, A. Gironell, J. Molet, B. Pascual-Sedano, B. Pidoux, A. M. Bonnet, Y. Agid, J. Xie, A. L. Benabid, A. M. Lozano, J. Saint-Cyr, L. Romito, M. F. Contarino, M. Scerrati, V. Fraix, and N. Van Blercom. 2005. Bilateral deep brain stimulation in Parkinson's disease: a multicentre study with 4 years follow-up. *Brain* 128 (Pt 10):2240-2249.
- Rodriguez-Pallares, J., J. A. Parga, A. Muñoz, P. Rey, M. J. Guerra, and J. L. Labandeira-Garcia. 2007. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem* 103 (1):145-156.
- Sahu, M. P., O. Nikkilä, S. Lågas, S. Kolehmainen, and E. Castrén. 2019. Culturing primary neurons from rat hippocampus and cortex. *Neuronal Signal* 3 (2):Ns20180207.
- Saryyeva, A., M. Nakamura, J. K. Krauss, and K. Schwabe. 2011. c-Fos expression after deep brain stimulation of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat 6-hydroxydopamine Parkinson model. *J Chem Neuroanat* 42 (3):210-217.
- Sauer, H., and W. H. Oertel. 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59 (2):401-415.
- Savica, R., B. R. Grossardt, J. H. Bower, J. E. Ahlskog, and W. A. Rocca. 2016. Time Trends in the Incidence of Parkinson Disease. *JAMA Neurol* 73 (8):981-989.
- Schmitt, O., and P. Eipert. 2012. neuroVIISAS: approaching multiscale simulation of the rat connectome. *Neuroinformatics* 10 (3):243-267.
- Schmitt, O., P. Eipert, R. Kettlitz, F. Leßmann, and A. Wree. 2016. The connectome of the basal ganglia. *Brain Struct Funct* 221 (2):753-814.
- Schrag, A., and J. M. Schott. 2006. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *Lancet Neurol* 5 (4):355-363.
- Schuepbach, W. M., J. Rau, K. Knudsen, J. Volkmann, P. Krack, L. Timmermann, T. D. Hälbig, H. Hesekamp, S. M. Navarro, N. Meier, D. Falk, M. Mehdorn, S. Paschen, M. Maarouf, M. T. Barbe, G. R. Fink, A. Kupsch, D. Gruber, G. H. Schneider, E. Seigneuret, A. Kistner, P. Chaynes, F. Ory-Magne, C. Brefel Courbon, J. Vesper, A. Schnitzler, L. Wojtecki, J. L. Houeto, B. Bataille, D. Maltête, P. Damier, S. Raoul, F. Sixel-Doering, D. Hellwig, A. Gharabaghi, R. Krüger, M. O. Pinsker, F. Amtage, J. M. Régis, T. Witjas, S. Thobois, P. Mertens, M. Kloss, A. Hartmann, W. H. Oertel, B. Post, H. Speelman, Y. Agid, C. Schade-Brittinger, and G. Deuschl. 2013. Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. *N Engl J Med* 368 (7):610-622.
- Schulte, T., S. Brecht, T. Herdegen, M. Illert, H. M. Mehdorn, and W. Hamel. 2006. Induction of immediate early gene expression by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats. *Neuroscience* 138 (4):1377-1385.
-

- Schumacher, F. K., L. V. Schumacher, F. Amtage, A. Horn, K. Egger, T. Piroth, C. Weiller, B. O. Schelter, V. A. Coenen, and C. P. Kaller. 2021. The rostro-caudal gradient in the prefrontal cortex and its modulation by subthalamic deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Sci Rep* 11 (1):2138.
- Schwalb, J. M., and C. Hamani. 2008. The history and future of deep brain stimulation. *Neurotherapeutics* 5 (1):3-13.
- Shaulian, E., and M. Karin. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20 (19):2390-2400.
- Shehab, S., C. D'Souza, M. Ljubisavljevic, and P. Redgrave. 2014. High-frequency electrical stimulation of the subthalamic nucleus excites target structures in a model using c-fos immunohistochemistry. *Neuroscience* 270:212-225.
- Sheng, M., and M. E. Greenberg. 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4 (4):477-485.
- Shin, H. W., and S. J. Chung. 2012. Drug-induced parkinsonism. *J Clin Neurol* 8 (1):15-21.
- Shon, Y. M., S. Y. Chang, S. J. Tye, C. J. Kimble, K. E. Bennet, C. D. Blaha, and K. H. Lee. 2010. Comonitoring of adenosine and dopamine using the Wireless Instantaneous Neurotransmitter Concentration System: proof of principle. *J Neurosurg* 112 (3):539-548.
- Spieles-Engemann, A. L., M. M. Behbehani, T. J. Collier, S. L. Wohlgenant, K. Steece-Collier, K. Paumier, B. F. Daley, S. Gombash, L. Madhavan, G. T. Mandybur, J. W. Lipton, B. T. Terpstra, and C. E. Sortwell. 2010. Stimulation of the rat subthalamic nucleus is neuroprotective following significant nigral dopamine neuron loss. *Neurobiol Dis* 39 (1):105-115.
- Spieles-Engemann, A. L., K. Steece-Collier, M. M. Behbehani, T. J. Collier, S. L. Wohlgenant, C. J. Kemp, A. Cole-Strauss, N. D. Levine, S. E. Gombash, V. B. Thompson, J. W. Lipton, and C. E. Sortwell. 2011. Subthalamic nucleus stimulation increases brain derived neurotrophic factor in the nigrostriatal system and primary motor cortex. *J Parkinsons Dis* 1 (1):123-136.
- Statz, M., F. Schleuter, H. Weber, M. Kober, F. Plocksties, D. Timmermann, A. Storch, and M. Fauser. 2023. Subthalamic nucleus deep brain stimulation does not alter growth factor expression in a rat model of stable dopaminergic deficiency. *Neurosci Lett* 814:137459.
- Stoker, T. B., and J. C. Greenland. 2018. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects. In *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, edited by T. B. Stoker and J. C. Greenland. Brisbane (AU): Codon Publications. Copyright © 2018 Codon Publications.
- Subramaniam, S. R., and H. J. Federoff. 2017. Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 9:176.
- Tabrez, S., N. R. Jabir, S. Shakil, N. H. Greig, Q. Alam, A. M. Abuzenadah, G. A. Damanhour, and M. A. Kamal. 2012. A synopsis on the role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11 (4):395-409.
- Temel, Y., V. Visser-Vandewalle, S. Kaplan, R. Kozan, M. A. Daemen, A. Blokland, C. Schmitz, and H. W. Steinbusch. 2006. Protection of nigral cell death by bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Brain Res* 1120 (1):100-105.
- Theodore, S., and W. Maragos. 2015. 6-Hydroxydopamine as a tool to understand adaptive immune system-induced dopamine neurodegeneration in Parkinson's disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 37 (4):393-399.
- Trepel, M. 2021. *Neuroanatomie: Struktur und Funktion* Vol. 8. Deutschland: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Umino, A., T. Nishikawa, and K. Takahashi. 1995. Methamphetamine-induced nuclear c-Fos in rat brain regions. *Neurochem Int* 26 (1):85-90.
- Ungerstedt, U., M. Herrera-Marschitz, L. Ståhle, U. Tossman, and T. Zetterström. 1985. Functional classification of different dopamine receptors. *Psychopharmacology Suppl* 2:19-30.

- van Domburg, P. H., and H. J. ten Donkelaar. 1991. The human substantia nigra and ventral tegmental area. A neuroanatomical study with notes on aging and aging diseases. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 121:1-132.
- van Hartevelt, T. J., J. Cabral, G. Deco, A. Møller, A. L. Green, T. Z. Aziz, and M. L. Kringelbach. 2014. Neural plasticity in human brain connectivity: the effects of long term deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *PLoS One* 9 (1):e86496.
- Velazquez, F. N., B. L. Caputto, and F. D. Boussin. 2015. c-Fos importance for brain development. *Aging (Albany NY)* 7 (12):1028-1029.
- Voges, J., R. Hilker, K. Bötzel, K. L. Kiening, M. Kloss, A. Kupsch, A. Schnitzler, G. H. Schneider, U. Steude, G. Deuschl, and M. O. Pinsker. 2007. Thirty days complication rate following surgery performed for deep-brain-stimulation. *Mov Disord* 22 (10):1486-1489.
- Voges, J., L.T., C. Oehr, I. Weber. 2018. Grundlagen der tiefen Hirnstimulation, in Tiefe Hirnstimulation Grundlagen, Indikationen, Verfahren. . *de Gruyter Berlin*:p. 218.
- Volkman, J., E. Moro, and R. Pahwa. 2006. Basic algorithms for the programming of deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Mov Disord* 21 Suppl 14:S284-289.
- Wada, M., S. Moizumi, and S. Kitazawa. 2005. Temporal order judgment in mice. *Behavioural Brain Research* 157 (1):167-175.
- Walker, H. C., R. L. Watts, S. Guthrie, D. Wang, and B. L. Guthrie. 2009. Bilateral effects of unilateral subthalamic deep brain stimulation on Parkinson's disease at 1 year. *Neurosurgery* 65 (2):302-309; discussion 309-310.
- Werner Poewe, A. A., K Ray Chaudhuri, María C Rodríguez-Oroz. 2019. Beyond Motor Symptom Wearing-off in Parkinson's Disease – What Have We Learned? *European Neurological Review* 14.
- Wessel, T. C., T. H. Joh, and B. T. Volpe. 1991. In situ hybridization analysis of c-fos and c-jun expression in the rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res* 567 (2):231-240.
- Yuan, H., S. Sarre, G. Ebinger, and Y. Michotte. 2005. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 144 (1):35-45.
- Zhao, M., S. Momma, K. Delfani, M. Carlen, R. M. Cassidy, C. B. Johansson, H. Brismar, O. Shupliakov, J. Frisen, and A. M. Janson. 2003. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (13):7925-7930.
- Zhao, Y. J., H. L. Wee, Y. H. Chan, S. H. Seah, W. L. Au, P. N. Lau, E. C. Pica, S. C. Li, N. Luo, and L. C. Tan. 2010. Progression of Parkinson's disease as evaluated by Hoehn and Yahr stage transition times. *Mov Disord* 25 (6):710-716.
- Zheng, W., L. Niu, C. Zhang, C. Zhu, F. Xie, C. Cao, and G. Li. 2014. Brain edema and protein expression of c-Fos and c-Jun in the brain after diffused brain injury. *Int J Clin Exp Pathol* 7 (6):2809-2817.
- Zhou, F. W., Y. Jin, S. G. Matta, M. Xu, and F. M. Zhou. 2009. An ultra-short dopamine pathway regulates basal ganglia output. *J Neurosci* 29 (33):10424-10435.

VII. ANHANG

7.1 C-FOS⁺ ZELLEN NACH VIERSTÜNDIGER STIMULATION

Tabelle 2: Quantitative Analyse von c-Fos nach vierstündiger Stimulation. Quantitative Analyse von DAPI⁺, NeuN⁺, c-Fos Typ II⁺ und c-Fos Typ III⁺ Zellen im Bereich der Substantia nigra pars compacta (SNpc), Substantia nigra pars reticulata (SNpr) und Area tegmentalis ventralis (VTA) von zwei STN_{STIM4h}-Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Zellzahl von DAPI⁺ und NeuN⁺ Zellen der nicht-läsionierten Hemisphären ist in Zellen/mm³ angegeben. Die Zellzahl von DAPI⁺ und NeuN⁺ Zellen der läsionierten Hemisphäre sind auf die Zellzahlen der nicht-läsionierten Hemisphäre normiert und dementsprechend in Prozent gezeigt. Die c-Fos Typ II⁺ und c-Fos Typ III⁺ Zellen sind auf die Neuronenzahl der nicht-läsionierten bzw. läsionierten Hemisphären normiert und als Prozentwerte dargestellt. Es erfolgte keine qualitative statistische Analyse, da n = 2. *Abkürzungen: DAPI – 4'-Diamidin-2-phenylindol, NeuN – Neuronales Nuclei Antigen, STN – Nucleus subthalamicus, TH – Tyrosinhydroxylase.*

Quantitative Analyse von c-Fos nach vierstündiger Stimulation			
Substantia nigra pars compacta			
DAPI ⁺ Zellen (nicht-läsioniert)	DAPI ⁺ Zellen (läsioniert)	NeuN ⁺ Zellen (nicht-läsioniert)	NeuN ⁺ Zellen (läsioniert)
112.917	92,5 %	40.138	64,4 %
c-Fos Typ II ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (nicht-läsioniert)	c-Fos Typ II ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (läsioniert)	c-Fos Typ III ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (nicht-läsioniert)	c-Fos Typ III ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (läsioniert)
12,5 %	29,6 %	2,1 %	10,2 %
Substantia nigra pars reticulata			
DAPI ⁺ Zellen (nicht-läsioniert)	DAPI ⁺ Zellen (läsioniert)	NeuN ⁺ Zellen (nicht-läsioniert)	NeuN ⁺ Zellen (läsioniert)
82.013	116,0 %	12.048	49,9 %
c-Fos Typ II ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (nicht-läsioniert)	c-Fos Typ II ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (läsioniert)	c-Fos Typ III ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (nicht-läsioniert)	c-Fos Typ III ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (läsioniert)
10,4 %	26,0 %	-	2,3 %
Area tegmentalis ventralis			
DAPI ⁺ Zellen (nicht-läsioniert)	DAPI ⁺ Zellen (läsioniert)	NeuN ⁺ Zellen (nicht-läsioniert)	NeuN ⁺ Zellen (läsioniert)
147.222	81,1 %	43.055	75,8 %
c-Fos Typ II ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (nicht-läsioniert)	c-Fos Typ II ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (läsioniert)	c-Fos Typ III ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (nicht-läsioniert)	c-Fos Typ III ⁺ NeuN ⁺ / NeuN ⁺ (läsioniert)
9,4 %	16,6 %	2,9 %	2,1 %

7.2 MATERIALLISTEN

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Materialien mit Artikelnummer in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

7.2.1 MATERIALLISTE OPERATION (GERÄTE)

Material (Handelsname)	Artikelnummer	Firma
Bohrer (T-30 2,35 MM)	LA0999	Carlo De Giorgi, Via Tonale 1, 20021 Baranzate, Milano, Italien
Brückenmaterial (Luxatemp®)	772086	DMG chemisch pharmazeutische Fabrik GmbH, D-22547 Hamburg
Flussmittel/Löt-Draht	T5134	CFH Löt- und Gasgeräte GmbH, Bahnhofstraße 50, D-74254 Offenau
Haftvermittler, lichthärtend (Heliobond®)	W28595	Ivoclar Vivadent AG, Bendererstraße 2, FL-9494 Schaan, Liechtenstein
Kanülen (BD Microlance™ 3)	1705 19	Becton, Dickinson and Company, Becton Drive 1, NJ 07417 Franklin Lakes, USA
Linsenkopfschrauben	7981-2-13	minischauben.com, Gmein 128a, D-94544 Hofkirchen
Lötkolben	AD 2200	Advanced JBC, Ramón y Cajal, 3,

ANHANG

		08750 Molins de Rei, Barcelona, Spanien
Lupe (Toolcraft®)	ZD 10MD	Conrad electronic international GmbH & Co. KG, Konrad Straße 1, D-92242 Hirschau
Narkosekammer (EZ-Anästhesia®)	EZ 1572	E-Z Systems Corporation, PA 18043 Palmer, USA
Oszillator (RIGOL®)	DS1054	UltraVision CLPL, Commerce Way 1, LU7 4RW Bedfordshire, Großbritannien
Skalpell (präzisa plus®)	17235803	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Emil-Hoffmann-Str. 53, D-50996 Köln
Spritze (Vol. 1ml) (BD 1ml Syring Luer-Lok™Tip)	7207887CAV13	Becton, Dickinson and Company, Becton Drive 1, NJ 07417 Franklin Lakes, USA
Spritze (Vol. 2ml) (BD Discardit™II)	1708 136	Becton, Dickinson and Company, Becton Drive 1, NJ 07417 Franklin Lakes, USA
Voltmeter (Voltcraft®)	VC 404 (415272)	Conrad electronic international GmbH & Co. KG, Konrad Straße 1, D-92242 Hirschau
Waage	DE 35KSD	Kern & Sohn GmbH, Ziegelei 1, D-72336 Balingen

7.2.2 MATERIALLISTE OPERATION (PHARMAKA/CHEMIKALIEN)

Material (Handelsname)	Konzentration	Artikelnummer	Firma
6-Hydroxydopamine (6-OHDA)	4 µl 6-OHDA á 6 µg/µl Gesamtdosis pro Tier 24µg	H4381	Sigma-Aldrich Corporate, 3050 Spruce Street, MO 63103 St. Louis, USA
Apomorphinhydrochlorid	10mg/1 ml	40612 A	Teclapharm GmbH, Postfach 2207, D-21312 Lüneburg
Augengel Carbomer (Vidiscic®)	2mg/1g	3627	Dr. Mann Pharma GmbH, Brunsbütteler Damm 165, D-13581 Berlin
Esketaminhydrochlorid (Ketanest®)	25mg/1ml	731072	Pfizer Pharma PFE GmbH, Linkstraße 10, D-10785 Berlin
Isofluran (Forene®)	1ml/1ml	606612	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Mainzer Straße 81, D-65189 Wiesbaden
Metamizol (Novaminsulfon®)	500mg/1ml	7K4272	Zentiva Pharma GmbH, Linkstraße 2, D-10785 Berlin
Natriumchloridlösung	0,009mg/1ml	1640024	B.Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
Paraformaldehydlösung	0,05mg/1ml	11762	Morphisto, Schumannstraße 144, D-63069 Offenbach am Main

ANHANG

Xylazinhydrochlorid (Rompun®)	20mg/1ml	KPOC4EF	Bayer Vital GmbH & Co., D-51368 Leverkusen
----------------------------------	----------	---------	---

7.2.3 MATERIALLISTE IMMUNHISTOCHEMIE (GERÄTE)

Material (Handelsname)	Artikelnummer	Firma
Analysenwaage	ABT 220-4M	KERN & Sohn GmbH, Ziegelei 1, D-72336 Balingen
Deckgläser	-	MEDITE Medical GmbH, Wollenweberstraße 12, D-31303 Burgdorf
Kryostat	CM3050 S	Leica Biosystems GmbH, Heidelberger Straße 17, D-69226 Nußloch
Multiwellplatte, 6 Well	665102	Greiner Bio One, Bad Haller Straße 32, 4550 Kremsmünster, Österreich
Multiwellplatte, 12 Well	662160	Greiner Bio One, Bad Haller Straße 32, 4550 Kremsmünster, Österreich
Multiwellplatte, 24 Well	657160	Greiner Bio One, Bad Haller Straße 32, 4550 Kremsmünster, Österreich
Objektträger	J1800AMNZ	Thermo fisher scientific GmbH, Im Steingrund 4, D-63303 Dreieich
Pipetten (Eppendorf Reference®)	-	Eppendorf SE, Barkhausenweg 1,

ANHANG

		D-22339 Hamburg
Thermoschüttler (Unimax 1010®)	543-12310-00	Heidolph Instruments GmbH, Walpersdorfer Straße 12, D-91126 Schwabach
Vortexmischer (V-1 plus®)	BS-010203-AAG	SIA Biosan, Ratsupites iela 7 k-2, LV-1067 Riga, Lettland
Zeiss Axio Imager.Z1 ApoTome microscope	-	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Carl Zeiss Promenade 10, D-07745 Jena

7.2.4 MATERIALLISTE IMMUNHISTOCHEMIE (CHEMIKALIEN)

Material (Handelsname)	Artikelnummer	Firma
Anti-NeuN Antibody chicken	ABN91/3496495	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, D-64293 Darmstadt
bisenzimideH (Hoechst)	046V4155V/1733139	Sigma-Aldrich Corporate, Spruce Street 3050, MO 63103 St. Louis, USA
c-Fos (9F6) Rabbit mAb	2250/10	Cell Signaling Technology Hanauer Landstrasse 291 B, D-60314 Frankfurt am Main
Dako Wash Puffer x10 (TBS-T)	S300685-2C	Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup, Dänemark

ANHANG

donkey anti-chicken CY3	703-165-155/136499	DIANOVA GmbH, Warnburgstraße 45, D-20354 Hamburg
donkey anti-mouse Alexa Fluor 647	A21206/1900251, 1984047	Life technologies Corporation, Willow Creek Road 1, 29851 Eugene, Oregon, USA
donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488	A31571/1927937, 1981155	Life technologies Corporation, Willow Creek Road 1, 29851 Eugene, Oregon, USA
Donkey Serum	017-000-121/148047, 143490	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., 872 West Baltimore Pike, 19390 West Grove, Pennsylvania, USA
Eindeckungsmedium (ProLong™Diamond Antifade)	P36970/2237597	Life technologies Corporation, Willow Creek Road 1 29851 Eugene, Oregon, USA
Anti-Iba1 antibody	Ab5076	Abcam plc Discovery Drive, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, Großbritannien
Monoclonal Anti-Tyrosine Hydroxylase antibody mouse	T1299/ 036M4860V, 045M4770V	Sigma-Aldrich Corporate, Offices Sigma-Aldrich, Spruce Street 3050, MO 63103, St. Louis, USA
NaCl	P029.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, D-76185 Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (D-PBS)	14190144	Life technologies Corporation, Willow Creek Road 1, 29851 Eugene, Oregon, USA

ANHANG

Salzsäure	109063	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, D-64293 Darmstadt
TRIS	4855.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, D-76185 Karlsruhe
Triton X 100	3051.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, D-76185 Karlsruhe
Tween 20	9005-64-5	Sigma-Aldrich Corporate, Spruce Street 3050, MO 63103, St. Louis, USA

7.2.5 MATERIALLISTE SOFTWARE

Material (Handelsname)	Firma
Verarbeitungs- und Analyse Software (ZEN Blue 3.1)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Carl Zeiss Promenade 10, D-07745 Jena
Statistiksoftware (Prism 9.0)	GraphPad Software Inc., 2365 Northside Dr. Suite 560, CA 92108 San Diego, USA

7.3 PROTOKOLLE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit angewendeten immunhistochemischen Färbungen zur Darstellung mitotischer und neuronaler Zellen im Bereich des Rattenhirns in ihren Protokollen beschrieben.

7.3.1 c-FOS-FÄRBEPROTOKOLL

Erster Tag

1. Hitzeinduzierter Antigengewinnung (Heat induced antigen retrieval)

- Schnitte in Filter überführen
- 3x10 Minuten Waschen TBST (1x)
- Citrat-Puffer für 1,5 Minuten bei 700 Watt in die Mikrowelle stellen
- Extra Wellplatte mit dem aufgekochten Citrat-Puffer befüllen (2 ml/Well)
- Filter mit Schnitten übersetzen
- 30 Minuten bei 95 °C im Wärmeschrank inkubieren
- 20 Minuten bei Raumluft abkühlen lassen
- 2 Mal 5 Minuten mit Aqua destillata waschen (2 ml/Well)
 - 3 Mal 10 Minuten mit TBST (1x) waschen (2 ml/Well)

2. Immunfärbung (erster Teil)

- **Blocklösung:** Pro Well 500 µl mit:
 - 440 µl Donkey Serum
 - 50 µl Triton Donkey Serum
 - 10 µl Triton-X 100 (10 % in Aqua destillata)

- Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur blocken (Schüttler verwenden)

- **Erste Antikörperinkubation:** Pro Well 500 µl TBST (1x) mit:

- mouse anti-TH-Antikörper	1:1000
- chicken anti-NeuN-Antikörper	1:1000
- rabbit anti-c-Fos-Antikörper	1:1000

- Über Nacht bei 4 °C inkubieren (Schüttler verwenden)

Zweiter Tag

3. Immunfärbung (zweiter Teil)

- 5 Mal 5 Minuten Waschen mit TBST (1x) (2 ml/Well)

Ab hier im Dunkeln arbeiten!

- **Zweite Antikörperinkubation:** Pro Well 500µl TBST (1x) mit:

- donkey anti-chicken CY3 1:250
- donkey anti-mouse Alexa Fluor 647 1:250
- donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 1:250
- 2 µl pro AK/500 µl TBST (1x)

- 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Schüttler verwenden)
- 3 Mal 10 Minuten Waschen mit TBST (1x) 2 ml/Well)

- **Dritte Kernfärbung mit Hoechst 33362:** Pro Well 3 ml PBS (1x) mit:

- 2,25 µl Hoechst 33362
- 3 Minuten bei Raumtemperatur
- 3 Mal 10 Minuten waschen mit PBS (1x) (2 ml/Well)

3. Aufziehen der Präparate

- Aufziehen der Präparate (im Dunkel)
- Eindecken der Objektträger mit ProLong Diamond (ungefähr 24 Stunden aushärtend lassen)
- ProLong Diamond 30 Minuten vorher bei 37 °C „mit dem Kopf nach unten“ erwärmen
- Lagerung der eingedeckelten Präparate bei 4 °C

4. Zusatz: Ansetzen des Citrat-Puffers

- Für einen Liter Natrium-Citrat-Puffer:
 - 2,94 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat in einem Liter Aqua destillata auflösen
 - Mittels Salzsäure (HCl_(aq)) auf einen pH-Wert von 6 titrieren
 - Falls der Puffer zu sauer ist mit 0,5 ml TWEEN 20

7.3.2 IBA-1-FÄRBEPROTOKOLL

Erster Tag

1. Hitzeinduzierter Antigengewinnung (Heat induced antigen retrieval)

- Schnitte in Filter überführen
- 3x10 Minuten Waschen TBST (1x)
- Citrat-Puffer für 1,5 Minuten bei 700 Watt in die Mikrowelle stellen
- Extra Wellplatte mit dem aufgekochten Citrat-Puffer befüllen (2 ml/Well)
- Filter mit Schnitten übersetzen
- 30 Minuten bei 95 °C im Wärmeschrank inkubieren
- 20 Minuten bei Raumluft abkühlen lassen
- 2 Mal 5 Minuten mit Aqua destillata waschen (2 ml/Well)
 - 3 Mal 10 Minuten mit TBST (1x) waschen (2 ml/Well)

2. Immunfärbung (erster Teil)

- **Blocklösung:** Pro Well 500 µl mit:
 - 440 µl Donkey Serum
 - 50 µl Triton Donkey Serum
 - 10 µl Triton-X 100 (10 % in Aqua destillata)

- Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur blocken (Schüttler verwenden)

- **Erste Antikörperinkubation:** Pro Well 500 µl TBST (1x) mit:
 - goat anti-Iba-1-Antikörper 1:500
 - rabbit anti-c-Fos-Antikörper 1:1000

- Über Nacht bei 4 °C inkubieren (Schüttler verwenden)

Zweiter Tag

3. Immunfärbung (zweiter Teil)

- 5 Mal 5 Minuten Waschen mit TBST (1x) (2 ml/Well)

Ab hier im Dunkeln arbeiten!

- **Zweite Antikörperinkubation:** Pro Well 500µl TBST (1x) mit:

- donkey anti-goat Alexa Fluor 555 1:250
- donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 1:250
- 2 µl pro AK/500 µl TBST (1x)

- 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Schüttler verwenden)
- 3 Mal 10 Minuten Waschen mit TBST (1x) 2 ml/Well)

- **Dritte Kernfärbung mit Hoechst 33362:** Pro Well 3 ml PBS (1x) mit:

- 2,25 µl Hoechst 33362

- 3 Minuten bei Raumtemperatur
- 3 Mal 10 Minuten waschen mit PBS (1x) (2 ml/Well)

3. Aufziehen der Präparate

- Aufziehen der Präparate (im Dunkel)
- Eindecken der Objektträger mit ProLong Diamond (ungefähr 24 Stunden aushärtend lassen)
- ProLong Diamond 30 Minuten vorher bei 37 °C „mit dem Kopf nach unten“ erwärmen
- Lagerung der eingedeckelten Präparate bei 4 °C

VIII. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name, Vorname	Helf, Charlotte
Adresse	Weißenburgstraße 16, 24116 Kiel
Telefonnummer	+49 152 02742041
E-Mail	charlotte.helf@t-online.de, charlotte.helf@uksh.de
Geburtsdatum,-ort	11.08.1994, Gießen

Schul Ausbildung und Studium

04/2021 – dato	Ärztin in Weiterbildung am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
10/2013 – 11/2020	Studium der Humanmedizin, Universität Rostock Abschluss: Staatsexamen (Gesamtnote: 2,3)
08/2010 – 06/2013	Gymnasiale Oberstufe Marianum, Fulda Abschluss: Abitur (Note: 1,6)
09/2001 – 07/2010	Oberwaldschule, Grebenhain

Stipendien

12/2017 – 12/2018	Promotionsstipendium: Integrated Research Training Group (IRTG) des DFG Collaborative Research Centre (CRC) 1270 'Electrically Active Implants' (ELAINE), Universität Rostock
07/2017 – 09/2017	Forschungsstipendium: Research and Innovation Staff Exchange (RISE) des Deutschen Akademischen Austauschdienst, Charles Sturt University, Albury, Australien

Publikationen

- Helf C., M. Weichenthal, K. Kähler. Management of muscle spasms induced by sonidegib in a 93-year-old patient with a multimodal gait disorder. Poster #A230. European Association of Dermato-Oncology (EADO) Congress; April 2024; Paris, Frankreich.
- Helf C., M. Weichenthal, J. Weis, K. Kähler. Langanhaltende Remission durch Immunkombinationstherapie nach akut lebensbedrohlichem Progress eines HLA-A*02:01-negativen ADM. Poster #P091. Deutscher Hautkrebskongress; Sept. 2023; Hamburg, Deutschland.
- Helf C., M. Kober, F. Markert, J. Lanto, L. Overhoff, K. Badstübner-Meeske, A. Storch, M. Fauser. Subthalamic nucleus deep brain stimulation induces nigrostriatal dopaminergic plasticity in a stable rat model of Parkinson's disease. Neuroreport. 2023 Jun 7;34(10):506511.
- Yousef H., A.H. Khandoker, S.F. Feng, C. Helf, H.F. Jelinek. Inflammation, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the progression of type II diabetes mellitus with coexisting hypertension. Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Jun 13; 14:1173402.
- Jelinek H.F., C. Helf, K. Khalaf. Human SHC-transforming protein 1 and its isoforms p66shc: A novel marker for prediabetes. J Diabetes Investig. 2021 Oct;12(10):1881-1889.
- Wang R., C. Helf, L. Tizek, R. Neuhauser, K. Eyerich, A. Zink, et al. The Impact and Consequences of SARS-CoV 2 Pandemic on a Single University Dermatology Outpatient Clinic in Germany. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2020;17(17):6182.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

IX. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)