

# **Etablierung eines verbesserten chronisch- neurotoxikologischen Parkinson-Mausmodells**

Annabelle Zimmermann

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität, Gießen

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. M. Diener**

**und**

**dem Physiologischen Institut II  
der Goethe Universität Frankfurt/M.  
Betreuer: Prof. Dr. J. Roeper**

# **Etablierung eines verbesserten chronisch- neurotoxikologischen Parkinson-Mausmodells**

## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Annabelle Zimmermann**

Tierärztin aus Frankfurt/M.

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. M. Diener  
Prof. Dr. J. Roeper

Tag der Disputation: 19.12.2013

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Das dopaminerge Mittelhirnsystem</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Dopamin</b>	<b>13</b>
<b>1.3 Morbus Parkinson</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Das Tiermodell</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Ziel</b>	<b>25</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>27</b>
<b>2.1.1 Versuchstiere</b>	<b>27</b>
<b>2.1.2 Lösungen</b>	<b>28</b>
<b>2.1.3 Enzyme/Antikörper</b>	<b>29</b>
<b>2.1.4 Osmotische Pumpe und Brain Infusion Kit</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Methoden I: Pumpenimplantation</b>	<b>32</b>
<b>2.2.1 Narkose und Analgesie</b>	<b>32</b>
<b>2.2.2 Einsetzen der Pumpe</b>	<b>32</b>
<b>2.2.3 Stereotaxie</b>	<b>34</b>

2.2.4	Postoperative Versorgung	37
2.3	Methoden II: Histologie und Immuncytochemie	40
2.3.1	Perfusion und Präparation des Gewebes	40
2.3.2	Antikörperreaktion und ABC/DAB-Färbung	41
2.4	Methode III: Stereologische Quantifizierung	42
2.4.1	StereolInvestigator-Analyse	42
2.4.2	Optical Fractionator	45
2.4.3	Fehlerabschätzung (coefficient of error) nach Gundersen	47
2.5	Methoden IV: Optische Dichte-Messung	48
2.6	Statistik	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Stereologische Quantifizierung dopaminerger TH-positiver SN Neurone	51
3.2	Dendritische Schädigung in der SN	57
3.3	Optische Dichte-Messungen der TH-Immuno- reaktivität im Striatum	57
4	Diskussion	64
4.1	Zusammenfassung der Befunde	64
4.1.1	Zellzahlerhöhung TH-positiver SN-Zellen	64

<b>4.1.2</b>	<b>Dendritische Schädigung in der SN</b>	<b>65</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Reduktion der optischen Dichte der TH-Immunoreaktivität im Striatum</b>	<b>65</b>
<b>4.1.4.</b>	<b>Reduzierte Mortalität und Belastung der Versuchstiere</b>	<b>66</b>
<b>4.2</b>	<b>Neurodegeneration oder adulte Neurogenese?</b>	<b>67</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Adulte Neurogenese</b>	<b>67</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Transdifferenzierung zu TH-positiven Neuronen</b>	<b>76</b>
<b>4.2.3.</b>	<b>Die Möglichkeit eines Auswertungsfehlers</b>	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>86</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
	<b>Veröffentlichung</b>	<b>101</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>102</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>103</b>

## Abbkürzungen

AADC	Aromatic L-amino acid decarboxylase
ACSF	künstliches Hirnwasser (artificial cerebrospinal fluid)
AK	Antikörper
AN	Nukleus arcuatus (arcuate nucleus)
BO	Bulbus olfaktorius
BrdU	Bromodesoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CX I	Komplex I (mitochondriale Atmungskette)
DA	Dopamin
DAB	Diaminobenzidin
DAT	Dopamin-Transporter
DBH	Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase
DKI	David Kopf Instruments, Tujunga, CA
DS	Dorsales Striatum
DSc	Dorsales Striatum contralateral
DSi	Dorsales Striatum ipsilateral
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
Hc	Hippocampus

icv	intraventrikulär
i.p.	intraperitoneal
KGW	Körpergewicht
LM	Lemniscus medialis
MAO B	Monoaminoxidase B
MH	Mittelhirn
MPP+	1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium-Ion
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,4-Tetra- Hydropyridin
MW	Mittelwert
NG	Neurogenese
NSC	neuronale Stammzelle  (neuronal stem cell)
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PARK-Gene	Gene, die in Zusammenhang mit Morbus Parkinson stehen
PBS	phosphat buffered saline
PD	Morbus Parkinson (Parkinson's disease)
ROI	region of interest
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
s.c.	subkutan
SEM	Standard error of the mean



SGZ	Subgranuläre Zone
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra, pars compacta
SNr	Substantia nigra, pars reticulata
SNI	Substantia nigra, pars lateralis
STN	subthalamic nucleus
SVZ	Subventrikuläre Zone
TH	Tyrosinhydroxylase
VS	Ventrales Striatum
VSc	Ventrales Striatum, contralateral
VSi	Ventrales Striatum, ipsilateral
VMAT	vesicular monoamine transporter
VTA	Ventrales Tegmentales Areal

# 1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein verbessertes chronisches Parkinson-Mausmodell, in dem das Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium-Ion (MPP<sup>+</sup>) verwendet wurde. Die Tiere erhielten das Toxin intraventrikulär (icv) über 4 Wochen mittels einer subkutan implantierten osmotischen Pumpe und einem Katheter in den lateralen Ventrikel. Kontrolltiere erhielten nur das Lösungsmittel (artificial cerebrospinal fluid, ACSF). Nach 4 Wochen Pumplaufzeit wurden die Pumpen explantiert. Nach weiteren 4 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und perfundiert und ihre Gehirne immunhistochemisch aufgearbeitet. Es wurde eine quantitative StereoInvestigator-Analyse Tyrosinhydroxylase (TH)-immunopositiver (d.h. dopaminerger) Substantia nigra (SN)-Neurone und eine Grauwert-Messung der optischen Dichte der axonalen TH-Immunoreaktivität in den striatalen Projektionsarealen durchgeführt.

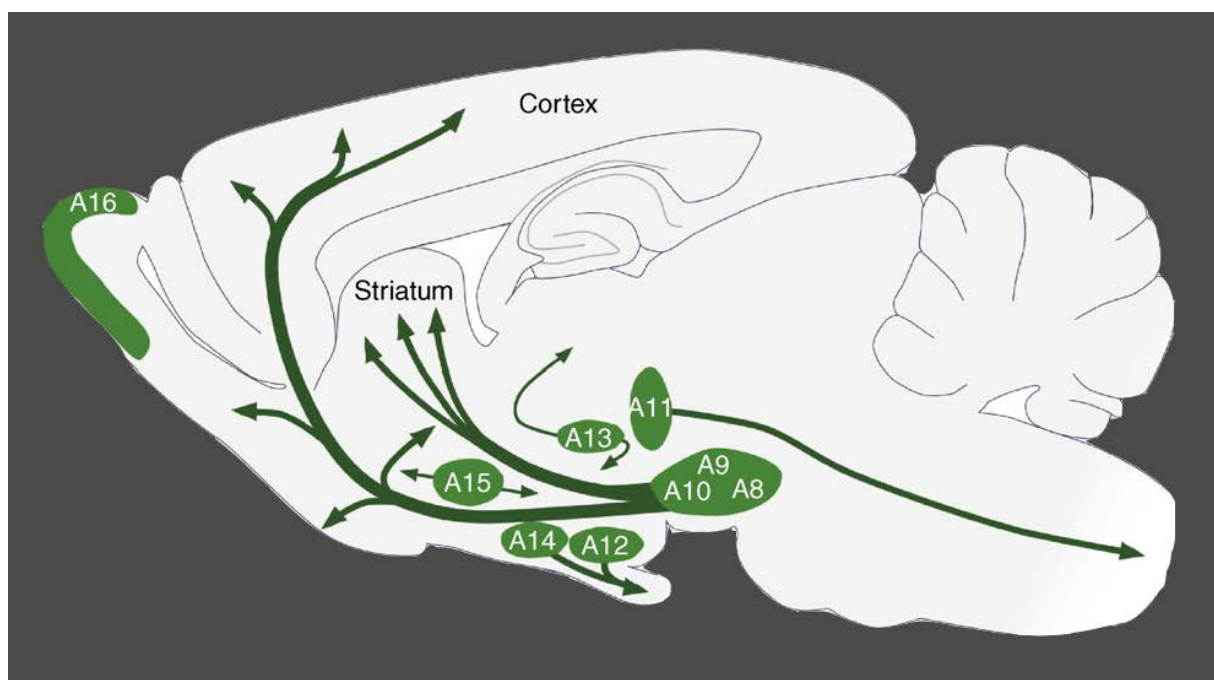
## 1.1. Das dopaminerge Mittelhirnsystem

Das dopaminerge Mittelhirnsystem reguliert essentielle Funktionen des Organismus: Bewegung, Kognition, Motivation und Emotion, neuroendokrine Steuerung, Aufmerksamkeit, assoziatives Lernen, zielgerichtetes Verhalten und Belohnung. Mit Degeneration oder Fehlfunktionen des dopaminergen Mittelhirnsystems assoziierte Krankheiten sind Morbus Parkinson, Morbus Huntington, das Tourette-Syndrom, Schizophrenie, sowie das Aufmerksamkeits- und Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) und Suchterkrankungen.

1962 gelang es Carlsson und Kollegen erstmals die Katecholamine Noradrenalin und Dopamin visuell darzustellen (Carlsson et al. 1962). Sie wendeten die von Falck und Kollegen entwickelte Formaldehyd-Histofluoreszenz-Methode an (Falck et al. 1962). 1964 wurde von Dahlström und Fuxe ein detailliertes Verteilungsmuster der katecholaminergen und serotoninerger Neurone veröffentlicht (Dahlström & Fuxe 1964). Sie teilten die Neurone in 12 Zellgruppen ein (A1-12), die sich von der Medulla oblongata bis zum Hypothalamus

erstreckten. Fünf weitere Zellgruppen (A13-17) im Dienzephalon, dem Olfaktorischen Tuberkel (OB) und der Retina, sowie 3 Adrenalin-haltige Zellgruppen (C1-3) wurden später ergänzt (Hökfelt et al. 1984). Die Nomenklatur von Dahlström und Fuxe wurde bis heute beibehalten (Abb. 1; Björklund & Dunnett, 2007).

Ab den 1970-er Jahren ermöglichte die Einführung des immunhistochemischen Nachweises der Katecholamin-synthetisierenden Enzyme Tyrosinhydroxylase (TH), Aromatische L-Amino-Decarboxylase (AADC), Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH) und eine genauere Unterscheidung zwischen den Katecholaminen Dopamin und Noradrenalin.



**Abb. 1** Verteilung der dopaminergen Neuronen-Zellgruppen (A8-16) im schematischen Sagittalschnitt eines adulten Nagergehirns

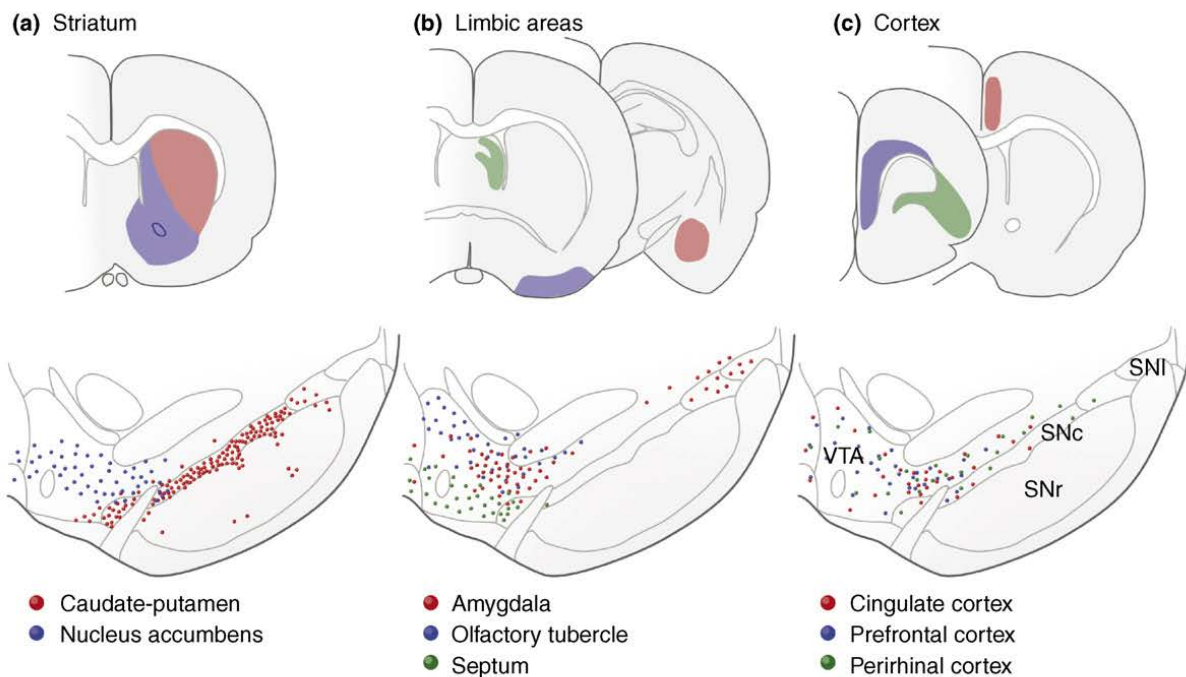
Die Einteilung ist die bis heute gültige nach Dahlström und Fuxe von 1964. Die Pfeile stellen die Hauptprojektionen dar. Die mesencephalen dopaminergen Neuronen-Gruppen sind: retrorubrale Region (A8), Ventral tegmental area (VTA) und Substantia nigra (A10).

(Quelle: Björklund & Dunnett, 2007)

A8-A16 sind dopaminerge Neuronen-Gruppen. Die drei dopaminergen Neuronen-Gruppen im Mittelhirn sind die retrorubrale Region (A8), die Ventral tegmental area (VTA) und die Substantia nigra (SN; A10). Die mesencephalen Projektionenorte sind das Striatum (mesostriatal), das Limbische System (mesolimbisch) und der Cortex (mesocortical). Die Aussage, die SN projiziert ausschließlich ins Striatum und die VTA in limbische und kortikale

Areale ist zu vereinfacht. Mittels retrograder Tracing-Methode stellte man fest, dass die Projektionswege (die Axone) mesostriatal, mesolimbisch und mesocortical anatomisch und funktional abgegrenzt sind, ihre Ursprungszellen aber in der A8-10-Region bestimmte Verteilungsmuster haben. Dieses Verteilungsmuster ist auch von der Art abhängig. Primaten (insbesondere der Mensch) haben anteilig mehr kortikale dopaminerge Projektionen im Vergleich zu denjenigen in Maus oder Ratte. Auch in der Anzahl dopaminerger Neurone unterscheiden sich Maus und Ratte von den Primaten. Die Maus besitzt in der A8-10-Zellgruppe beidseits 20 000-30 000 TH-positive Zellen, die Ratte 40 000-45 000. Die Hälfte der Zellen sind SN-Zellen. Bei den Primaten liegt die Anzahl TH-positiver mesencephaler dopaminerger Neurone beidseits bei 160 000-320 000, beim Mensch 400 000-600 000. Hier fallen ca. 70 % der Neurone auf die SN. Der Zuwachs an dopaminergen SN-Zellen bei Primaten im Vergleich zu den Nagern projiziert in den Cortex und hat seine Ursprungszellen gleichmäßig verteilt in den dorsalen Anteilen der A8-10-Gruppe. Aufgrund von Zusammengehörigkeit (Calbindin-Immunoreaktivität, Dopamin-Transporter-Expression) und Zell-morphologischen Aspekten wurden von Björklund und Dunnett die Begriffe dorsal und ventral tier verwendet. Es handelt sich dabei um die dorsale bzw. ventrale Etage der A8-10-Gruppe mit ihren Projektionen (Björklund & Dunnett, 2007).

Als nigrostriatale Projektion im engeren Sinne wird die Projektion von Zellen der SNc in den sensomotorischen (dorso-lateralen) Teil des Striatums bezeichnet. Die anteriomedialen und ventralen Teile des Striatums (Nucleus accumbens) stellen dagegen limbische Areale des Striatums dar. Sie erhalten ihre dopaminerge Innervation von Neuronen der lateralen VTA und der A8-Gruppe und aus anderen Hirnarealen (u.a. Hippocampus, Amygdala, Prefrontalem Cortex und serotoninerger Bahnen; Björklund & Dunnett, 2007; Abb. 2).



**Abb. 2** Schematische Darstellung der Ursprungs-Neurone der (a) mesostriatalen, (b) mesolimbischen und (c) mesocortikalen Projektionswege im Rattehirn

Die Neurone der 3 Projektionswege sind teilweise untereinander vermischt: Die Zellen der ventral tier der SNc (rote Punkte in (a)) innervieren wahrscheinlich ausschließlich in den sensomotorischen Anteil des Striatums (roter Bereich im Striatum in (a)). Die Zellen der dorsal tier hingegen projizieren an verschiedene Orte im limbischen System (b) und im Cortex (c).

(Quelle: Björklund und Dunnett 2004)

Die mesostriatal projizierenden dopaminergen SN-Neurone steuern hauptsächlich sensomotorische Abläufe (z.B. Stimulus-Antwort Verhalten) im Regelkreis des Basalgangliensystems. Die mesolimbischen Bahnen sind Teil des Motivations- und Belohnungssystems des Gehirns. Die mesocortikalen Projektionen, im speziellen die mesoprefrontalen, werden mit Kognition und Arbeitsgedächtnis (working memory) in Verbindung gebracht (Schultz 1998, 2002).

## 1.2 Dopamin

Dopamin ist ein Hormon und ein Neurotransmitter aus der Klasse der Katecholamine. Die Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin werden alle aus der Aminosäure L-Tyrosin synthetisiert (Abb. 3). Die beiden Enzyme der Dopamin-Synthese Tyrosinhydroxylase (TH) und die Aromatische L-Amino-Decarboxylase (AADC) spielen eine

wichtige Rolle bei der Identifikation dopaminerger Neurone mittels immunhistochemischer Analyse. Weitere Charakteristika dopaminerger Neurone sind die Koexpression vom Vesikulären Monoamin-Transporter 2 (VMAT2) und dem Dopamin-Transporter (DAT). Dopamin wird nach seiner Synthese im dopaminergen Neuron mittels VMAT2 in Vesikel aufgenommen und in den Terminalen gespeichert. Die Freisetzung in den synaptischen Spalt erfolgt in Form von einer Volumentransmission (Zoli & Agnati 1996). Im Unterschied zu einer an einen Kanal gebundenen Freisetzung (wiring transmission), entspricht diese Freisetzung einer Diffusion aus der Zelle in den extrazellulären Raum (volume transmission). Man spricht auch von geschlossenen und offenen Synapsen. Der DAT wird für die Wiederaufnahme von Dopamin aus dem synaptischen Spalt benötigt (Abb. 4; Ugrumov 2009). Der Abbau des Dopamins erfolgt durch die Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und Catechol-O-methyltransferase (COMT).

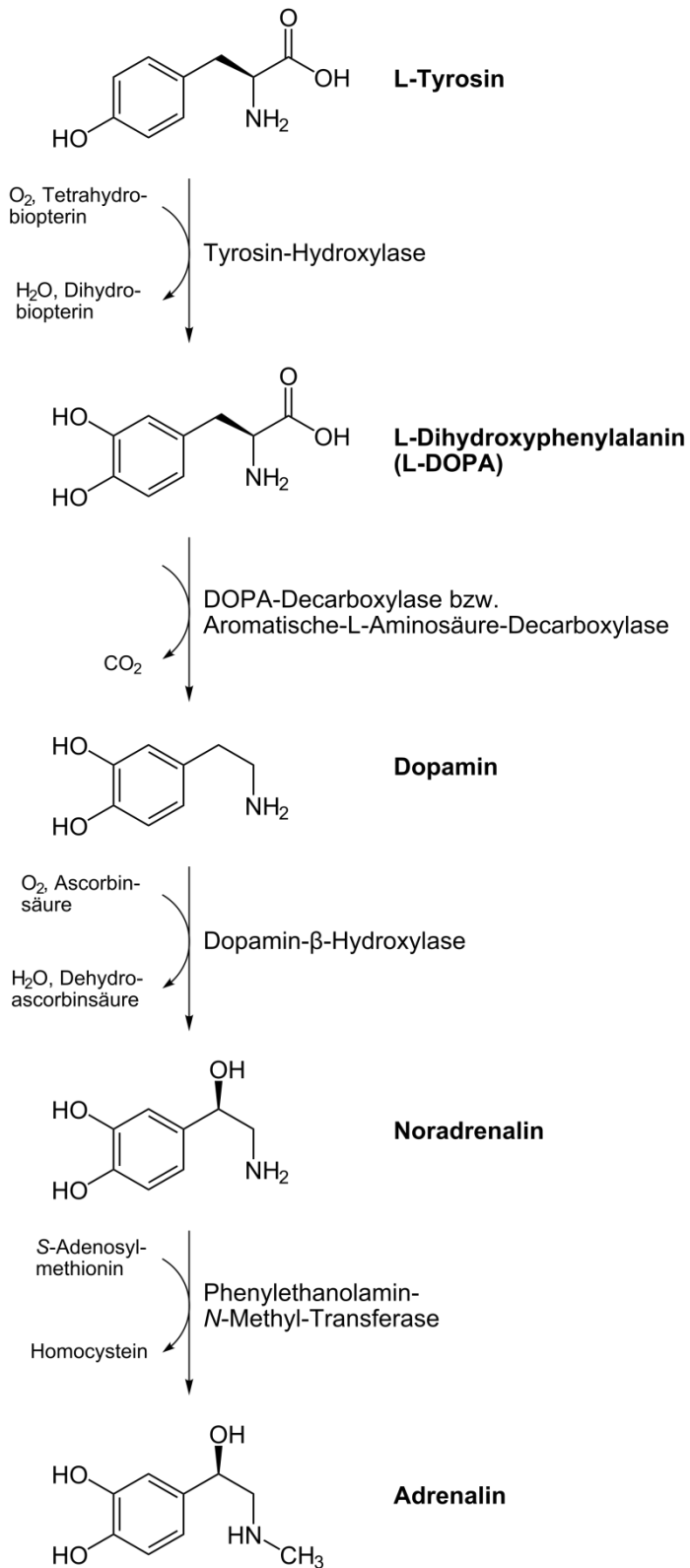


Abb. 3 Synthese der Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin aus L-Tyrosin

(Quelle: Wikipedia)

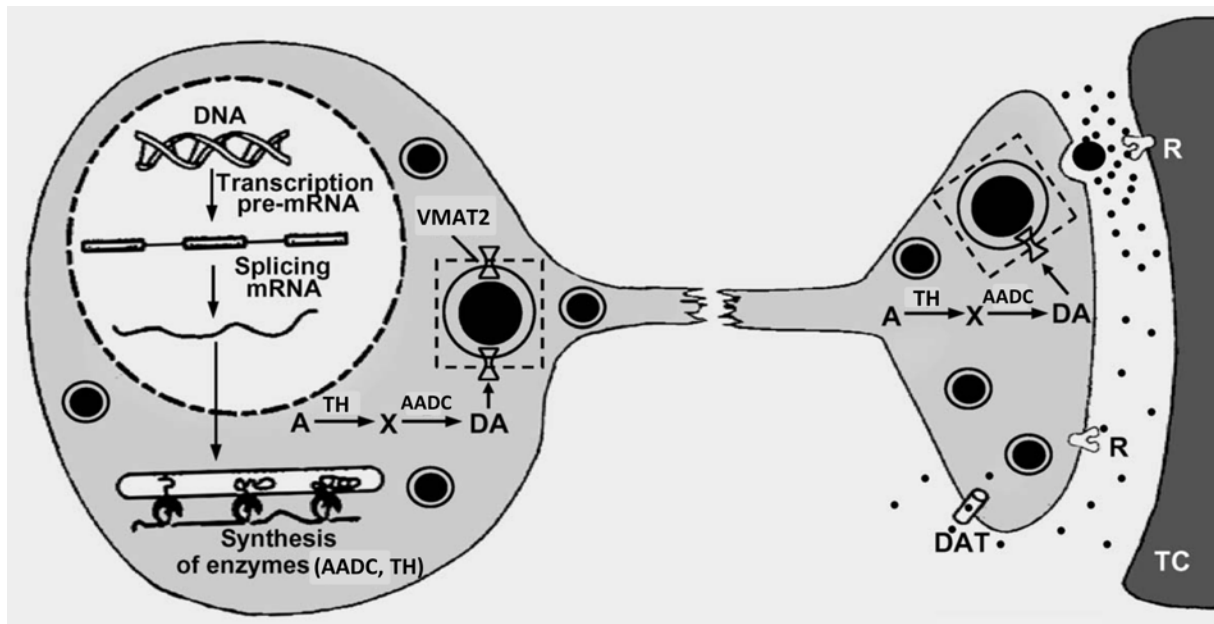


Abb. 4 Schematische Darstellung der Abläufe in einem dopaminergen Neuron

Darstellung der Transkription und Translation der beiden Enzyme Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (AADC) und Tyrosinhydroxylase (TH). Sie bewirken die Synthese von Dopamin (DA) aus der Aminosäure L-Tyrosin (A) über L-Dopa (X). Dopamin wird über den Vesikeltransporter VMAT2 in Vesikeln gespeichert. Sowohl an der Zielzelle (target cell, TC) als auch an der Presynapse befinden sich Dopamin-Rezeptoren (R). Der Dopamin-Transporter (DAT) dient der Wiederaufnahme von Dopamin aus dem synaptischen Spalt.

(Quelle: Ugrumov 2009, modifiziert)

### 1.3 Morbus Parkinson

Morbus Parkinson (Parkinson's disease, PD) ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung, die häufigste ist die Alzheimersche Erkrankung (AD). Ungefähr 250 000 Menschen sind allein in Deutschland (ein bis zwei Prozent der 65-jährigen in der Bevölkerung) an PD erkrankt. Die Erkrankung tritt allmählich, im Schnitt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr auf und verkürzt die Lebenserwartung der Betroffenen. Die Patienten, die im Alter zwischen 40 und 64 Jahren erkranken, sterben im Schnitt etwa 10 Jahre früher verglichen mit der allgemeinen Bevölkerung (Ishihara et al. 2007). Basierend auf demographischen Prognosen kann davon ausgegangen werden, dass die Zahl der PD-Erkrankten in den nächsten Jahren deutlich ansteigen wird.



James Parkinson beschrieb die typischen Symptome der Krankheit als erster 1817: Ruhetremor, Verlangsamung der Bewegungen (Bradykinesie), Muskelsteifheit (Rigor) der Extremitäten und des Rumpfes, mangelnde Stabilität der aufrechten Körperhaltung (posturale Instabilität) und verringerte Gesichtsmimik. Die Patienten nehmen typischer Weise beim Gehen eine gebeugte Haltung ein und machen verkürzte Schritte. Mit dem Laufen verbundene Bewegungen wie Schwingen der Arme verkümmern. Auch Demenz und Depressionen können bei Morbus Parkinson erschwerend hinzukommen (Purves et al. 2004, Ries et al. 2008).

Morbus Parkinson führt u.a. zum Untergang dopaminerger Neurone im Mittelhirn hauptsächlich in ventro-lateralen Bereichen der Substantia nigra pars compacta, was zu einem Dopamin-Mangel im Striatum führt (Fearnley & Lees 1991, Damier et al. 1999). Auch andere Neurone in anderen Hirnarealen sind betroffen (noradrenerge Neurone im Locus coeruleus, Neurone der anterioren olfaktorische Strukturen und lower brain stem areas, z.B. cholinerge Neurone des Vagus-Kerns). Bei Auftreten erster klinischer Symptome sind bereits ca. 80% der Substantia nigra Neurone degeneriert (Abdulwahid Arif I. & Ahmad Khan 2010). Dies wirkt sich auf die funktionelle Aktivität im Regelkreis der Basalganglien aus.

### **Das Basalgangliensystem:**

Das Basalgangliensystem reguliert maßgeblich die Motorik. Es besteht aus dem Striatum (bestehend aus dem Putamen und dem Nucleus caudatus), dem Globus pallidus externus (GPe), dem Globus pallidus internus (GPi), dem Nucleus subthalamicus (STN), der Substantia nigra pars compacta (SNc) und Substantia nigra pars reticulata (SNr).

Bei der Verschaltung der Basalganglien unterscheidet man zwischen einem Motorik-förderndem direkten Weg und einem Motorik-hemmendem indirektem Weg (Abb. 5). Das Striatum erhält glutamaterge Afferenzen aus dem Kortex, die auf das Striatum erregend wirken. Man unterscheidet im Striatum einen Motorik-fördernden und einen Motorik-hemmenden Anteil. Die GABA-erge hemmende Projektion in den Globus pallidus internus bewirkt dort ebenfalls eine GABA-übermittelte Hemmung des Thalamus, was zu einer Glutamat-vermittelten Erregung des Motorkortex führt. Dies stellt den direkten Motorik-fördernden Weg im Basalgangliensystem dar. Der Motorik-hemmende Anteil des Striatums projiziert GABA-erg und hemmend in den Globus pallidus externus. Der Globus pallidus externus hemmt ebenfalls GABA-erg den Nucleus subthalamicus, der eine glutamaterge

Erregung des Globus pallidus internus bewirkt. Die Hemmung des Motorik-fördernden Globus pallidus externus und die daraus resultierende Enthemmung des Nucleus subthalamicus führt zu einer Verstärkung des Motorik-hemmenden Globus pallidus internus. Man bezeichnet dies den indirekten Motorik-hemmenden Weg.

Die Substantia nigra inhibiert den Motorik-hemmenden Anteil des Striatums, was ihr eine Motorik-fördernde Funktion zukommen lässt. Fällt diese Hemmung aus der Substantia nigra weg (bedingt durch einen Untergang dopaminergener Neurone), führt dies zu einer Stärkung des Motorik-hemmenden Anteils des Basalgangliensystems und die Symptome der Parkinson-Erkrankung treten auf (Trepel 1999).

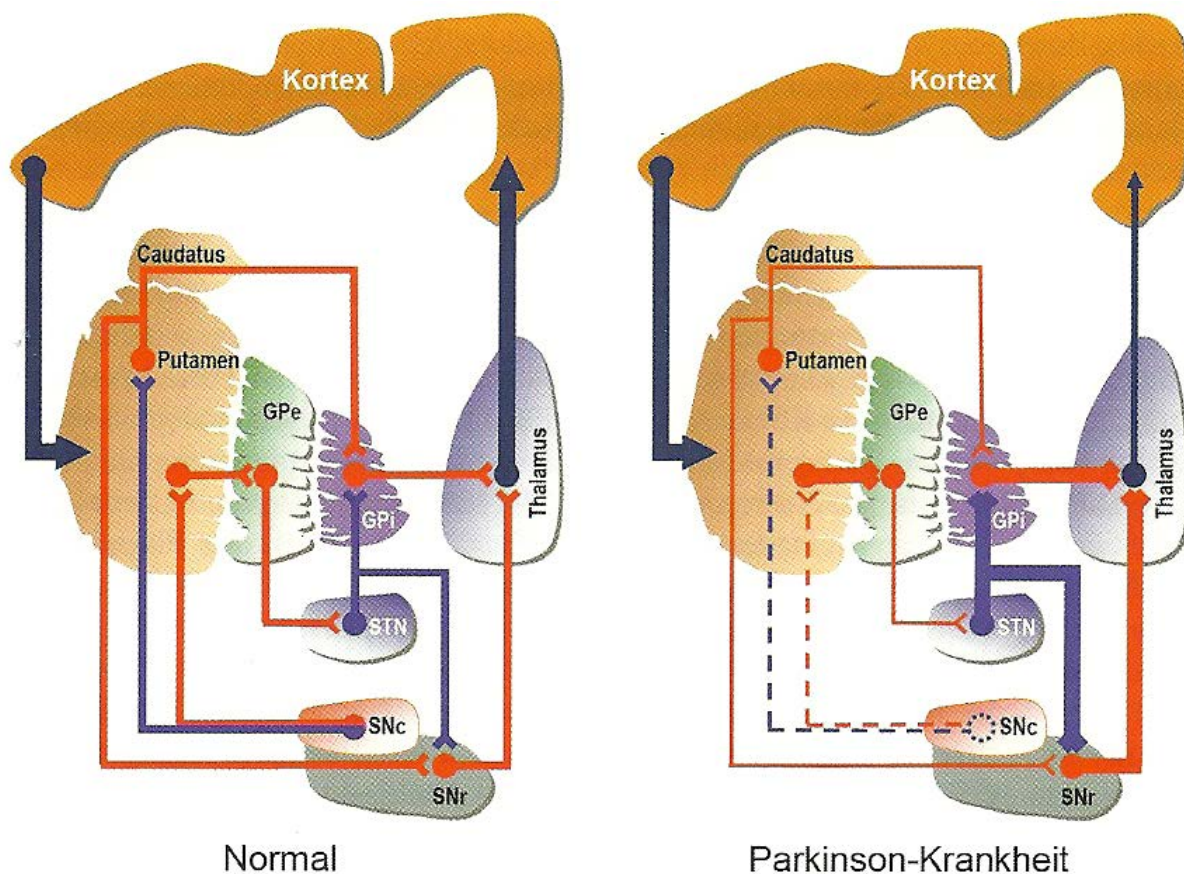


Abb. 5 Regelkreis der Basalganglien

Der Untergang dopaminergener Zellen in der Substantia nigra pars compacta (SNc) und pars reticulata (SNr) führt bei PD zu einem Dopamin-Mangel im Striatum (Caudatus und Putamen). Die daraus resultierende fehlende Hemmung aus dem Striatum und Globus pallidus externus (GPe) steigert die Aktivität des Nucleus subthalamicus (STN). Globus pallidus internus (GPI) und SNr erfahren durch den überaktiven STN eine übermäßige Aktivierung, was den Thalamus stärker hemmt. Der Motorkortex wird nur unzureichend stimuliert, was die Symptome von PD auslöst.

(rot: Motorik-hemmende Bahnen, blau: Motorik-fördernde Bahnen, Quelle: Ries et al. 2008)

### Ursachen und Pathomechanismen:

Die Ursache(n) und die Pathomechanismen der Erkrankung sind bisher nur teilweise aufgeklärt. Genetische Untersuchungen haben bestimmte PARK-Gene (Gene, die mit der Krankheit Parkinson assoziiert sind) identifiziert, die kausal seltene familiäre monogenetische Formen von PD verursachen. Diese familiären Formen der Erkrankungen bedingt durch eine einzelne Genmutation machen weniger als 10% der Erkrankungen aus. Genomweite Analysen bei der häufigen (90%) sporadischen PD-Form zeigen, dass auch bei ihr PARK-Gene einen Beitrag leisten (Hardy 2010). Die Erforschung dieser Gene ( $\alpha$ -synuclein, Parkin und DJ-1) trägt zur Klärung vieler pathomechanistischer Fragen sowohl bei der familiären als auch bei der sporadischen Form bei (Purves et al. 2004). Umwelteinflüsse wie Herbizide (Paraquat u.a.), Pestizide, 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,4-Tetra-Hydropyridin (MPTP)/Rotenon und andere Toxine sowie Schwermetall-Exposition wurden als Parkinson-fördernde Noxen identifiziert. Auch das Vorkommen von Parkinson in der Familie und eine voran gegangene Depression erhöhten das Risiko an Parkinson zu erkranken. Man vermutet ein multifaktorielles Geschehen (Sanyal et al. 2010, Abdulwahid Arif I. & Ahmad Khan 2010). Rauchen und Kaffee-/Tee-Genuss dagegen mindern das Risiko an Parkinson zu erkranken (Tan et al. 2003).

Ein wichtiges pathologisches Merkmal bei PD sind  $\alpha$ -synuclein-haltige Einschlusskörperchen im Zytosol dopaminerger Neurone (Lewy bodies). Diese Aggregation von fehlgefalteten Proteinen entsteht wahrscheinlich durch eine funktionelle Störung des Proteasoms (Ubiquitin-proteasom-System, UPS) in den Nervenzellen. Zudem weisen Substantia nigra (SN)-Neurone von Parkinson-Patienten eine reduzierte Aktivität am Komplex I der mitochondrialen Atemkette auf. Es wird vermutet, dass diese Komplex I-Dysfunktion zu einer Reduktion der mitochondrialen ATP-Produktion führt, was die proteasomale Aktivität herabsetzt. Zusätzlich erhöht eine Komplex I-Dysfunktion die Menge an ROS (reactive oxygen species), was die Menge an fehlgefalteten Proteinen ebenfalls erhöht. Die für viele PD-Modelle verwendeten Neurotoxine Rotenon und MPP<sup>+</sup> (wie auch in diesem Versuch verwendet, siehe unten) sind Komplex I-Inhibitoren (Liss et al. 2005, Höglinger et al. 2003).

### Therapie:

PD kann zurzeit nur symptomatisch im Sinne einer Dopamin-Substitution, Dopamin-Rezeptor-Stimulation oder Dopamin-Erhaltung erfolgen. Die bedeutendste medikamentöse

Therapie ist die Dopamin-Substitution mit L-Dopa, der Vorstufe des Dopamins (siehe Abb. 3). Durch die Einnahme von L-Dopa (im Gegensatz zu Dopamin überwindet es die Blut-Hirn-Schranke) können die Symptome der Erkrankung lange Zeit wirksam bekämpft werden. Nach mehrjähriger Einnahme und Fortschreiten der Erkrankung nehmen die unwillkürlichen Bewegungen (Dyskinesien) und die Dauer der sogenannten OFF-Phasen (Phasen der Akinesie/des Wirkungsverlustes der Medikamente) allerdings zu, was durch die nur wenige Stunden anhaltende Rezeptor-Stimulation des L-Dopa zu erklären ist. Aus diesem Grund wird die Erkrankung im Anfangsstadium und insbesondere bei jüngeren Patienten mit den länger wirkenden Dopamin-Agonisten behandelt. Die Stimulation der Dopamin-Rezeptoren bewirkt eine Linderung der Symptome. Die verschiedenen zur Verfügung stehenden Substanzen unterscheiden sich in Wirkeintritt, Wirkdauer, Galenik und Nebenwirkungen. Die unspezifischen Dopamin-Agonisten sind die klassischen Mutterkornalkaloide (Ergot-Derivate) Bromocriptin, Dihydroergocryptin, Lisurid, Pergolid und Cabergolid. Sie wirken an D<sub>1</sub>- wie auch an D<sub>2</sub>-Rezeptoren und anderen Rezeptortypen, was das Nebenwirkungsprofil erweitert. Die neueren Dopaminagonisten (Non-Ergot-Derivate) wirken selektiver am D<sub>2</sub>-Rezeptor (Piribedil, Pramipexol, Ropinirol und Rotigotin). Des Weiteren stehen Medikamente, die den Abbau Dopamins verzögern, indem sie das Dopamin-abbauende Enzym MAO B (Selegelin, Rasagelin) oder COMT (Entacapon und Tolacapon) hemmen, und Anticholinergika zur Verfügung. Die medikamentöse Therapie bedarf des genauen Abwägens des Nutzens und der Nebenwirkungen und muss dem Stadium der Erkrankung angepasst werden (Leitlinie Parkinson-Syndrom der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, [www.parkinson-web.de](http://www.parkinson-web.de), [www.de.brainexplorer.org](http://www.de.brainexplorer.org)).

Ein neurochirurgischer Eingriff, die Tiefenhirnstimulation, kann unter bestimmten Bedingungen durchgeführt werden. Sie wird vor allem im fortgeschrittenen Stadium der idiopathischen (sporadischen) Form der Erkrankung angewendet. Zu diesem Zeitpunkt kann oft keine lang anhaltende Besserung der Erkrankung mit Medikamenten mehr erzielt werden. Die Wirkung entspricht der des L-Dopa. Bei dieser Methode werden dem Patienten Elektroden dauerhaft implantiert, die über einen am Schlüsselbein subkutan implantierten Stimulator den Nucleus subthalamicus elektrisch stimulieren. Die Stimulation des Nucleus subthalamicus kann in der Stärke angepasst werden und ahmt seine physiologische Funktion im Regelkreis der Basalganglien nach (siehe oben). Dieser Eingriff ist mit einer verhältnismäßig niedrigen Komplikationsrate (schwere Komplikation liegen bei 0,5-3%)

verbunden und mit einem hohen Maß an Verbesserung der Lebensqualität für die Patienten verbunden (Ausmaß der Verbesserung der OFF-Symptome um 50-70%). (Leitlinie Parkinson-Syndrom der Deutschen Gesellschaft für Neurologie)

Vielversprechende Forschungszweige, die eine ursächliche Heilung des Morbus Parkinson anstreben, sind die Zelltherapie und die Gentherapie (Ries et al. 2008). Die Zelltherapie zielt darauf ab, die untergegangenen dopaminergen Zellen der SN zu ersetzen. Hervorzuheben sind zwei Forschungsbereiche aus der Zelltherapie, die auf aktuellen Erkenntnissen beruhen. Zum einen die Bemühungen autologe Zellen der adulten Neurogenese der Subventrikulären Zone (SVZ) und der Subgranulären Zone (SGZ) des Hippocampus zu entnehmen, in vitro zu modifizieren und als dopaminerge Ersatzzellen zur re-implantieren (Arias-Carrión & Yuan 2009). Zum anderen konnten Lie und Kollegen (Lie et al. 2002) belegen, dass die SN über pluripotente Vorläufer-Zellen verfügt, die nur aufgrund eines Neurogenese-hemmenden Umgebungsmilieus nicht zu Neuronen proliferieren. Eine Neurogenese-fördernde Manipulation dieses Mikromilieus und Anregung der Vorläufer-Zellen dopaminerge Neurone zu generieren, könnte den therapeutischen Durchbruch bei Morbus Parkinson liefern.

## 1.4 Das Tiermodell

Tiermodelle tragen entscheidend zur Erforschung der Ätiologie und Pathogenese von PD bei. Viele der in den letzten Jahrzehnten erlangten Erkenntnisse über die Hintergründe dieser Krankheit sind genetischen oder toxikologischen Tiermodellen zu verdanken. Darüber hinaus ermöglicht ein etabliertes Tiermodell die vereinfachte Erprobung neuer Therapien.

Die am häufigsten für Toxin-bedingte PD-Tiermodelle verwendeten Neurotoxine sind 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,4-Tetra-Hydropyridin (MPTP), 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), Rotenon und Paraquat. Das von uns eingesetzte 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium-Ion (MPP<sup>+</sup>) stellt den aktiven Metaboliten von MPTP dar.

MPTP wurde Anfang der 1980-er Jahre entdeckt, als 7 junge Drogenabhängige in Kalifornien auftauchten mit dem klinische Bild eines Morbus Parkinson. Bei der Herstellung der als synthetisches Heroin bekannten Droge 1-Methyl-4-Phenyl-4-Propionpiperidin (MPPP) wurden Fehler gemacht, die MPTP entstehen ließen. MPTP führte nach intravenöser

Injektion innerhalb weniger Tage zum Vollbild der Parkinson-Erkrankung. Der Neurologe J. William Langston entdeckte diesen Zusammenhang (Langston „The Case of the Frozen Addicts“) und erkannte auch den Nutzen von MPTP für die Forschung: so führte er erste Versuche mit MPTP an Affen durch. Im Nachbilden der Krankheitssymptome beim Primaten ist das MPTP-Toxinmodell den anderen Toxinmodellen überlegen: Das klinische Bild eines mit MPTP intoxikierten Affens gleicht symptomatisch sehr dem der Parkinson-Erkrankung beim Menschen. Die toxische Dosis für Primaten beträgt nur 0,05 mg/kg. Das lipophile MPTP kann bereits über Hautkontakt aufgenommen werden und passiert die Blut-Hirn-Schranke. Dies birgt den großen Nachteil des MPTP-Modells, dass der Umgang mit der Substanz für den Mensch extrem gefährlich ist. Es bestehen große Unterschiede in der Toxizität von MPTP zwischen den Tierarten. Bei Mäusen beträgt die toxische Dosis 20-30 mg/kg. Auch die Mäuse-Stämme sind unterschiedlich empfindlich, die von uns verwendete C57Bl6-Maus gilt als MPTP-empfindlichste. Die Empfindlichkeit nimmt mit dem Alter der Mäuse zu. Ratten sind dagegen fast völlig geschützt. Man vermutet, es könne mit der geringeren Menge des Enzyms Monoaminoxidase B (MAO B) im Rattengehirn zusammenhängen.

MAO B ist das Enzym in serotoninergeren und Glia-Zellen, das nach Passieren der Blut-Hirn-Schranke MPTP in MPP<sup>+</sup> umwandelt. MPP<sup>+</sup> wird in Folge selektiv vom Dopamin-Transporter (DAT) dopaminergener Neurone aufgenommen, d.h. MPTP-Toxinmodelle (wie auch 6-OHDA-Modelle) sind spezifisch für das dopaminerge System. Im Neuron wird das MPP<sup>+</sup>-Ion akkumuliert aufgrund des negativen Membranpotentials in den Mitochondrien, in denen es eine Inhibition des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette verursacht (Abb. 6). Durch diese Inhibition wird die Produktion von ROS erhöht, die u.a. auch ATP-sensitive Kaliumkanäle aktivieren können. Dieser Signalweg führt in chronischen MPTP-Mausmodellen zu einer Degeneration der dopaminergen SN-Neuronen (Liss et al. 2005). Ob es auch zu einem relevanten Abfall der ATP-Produktion kommt, ist zumindest für chronische Modelle weiterhin unklar.

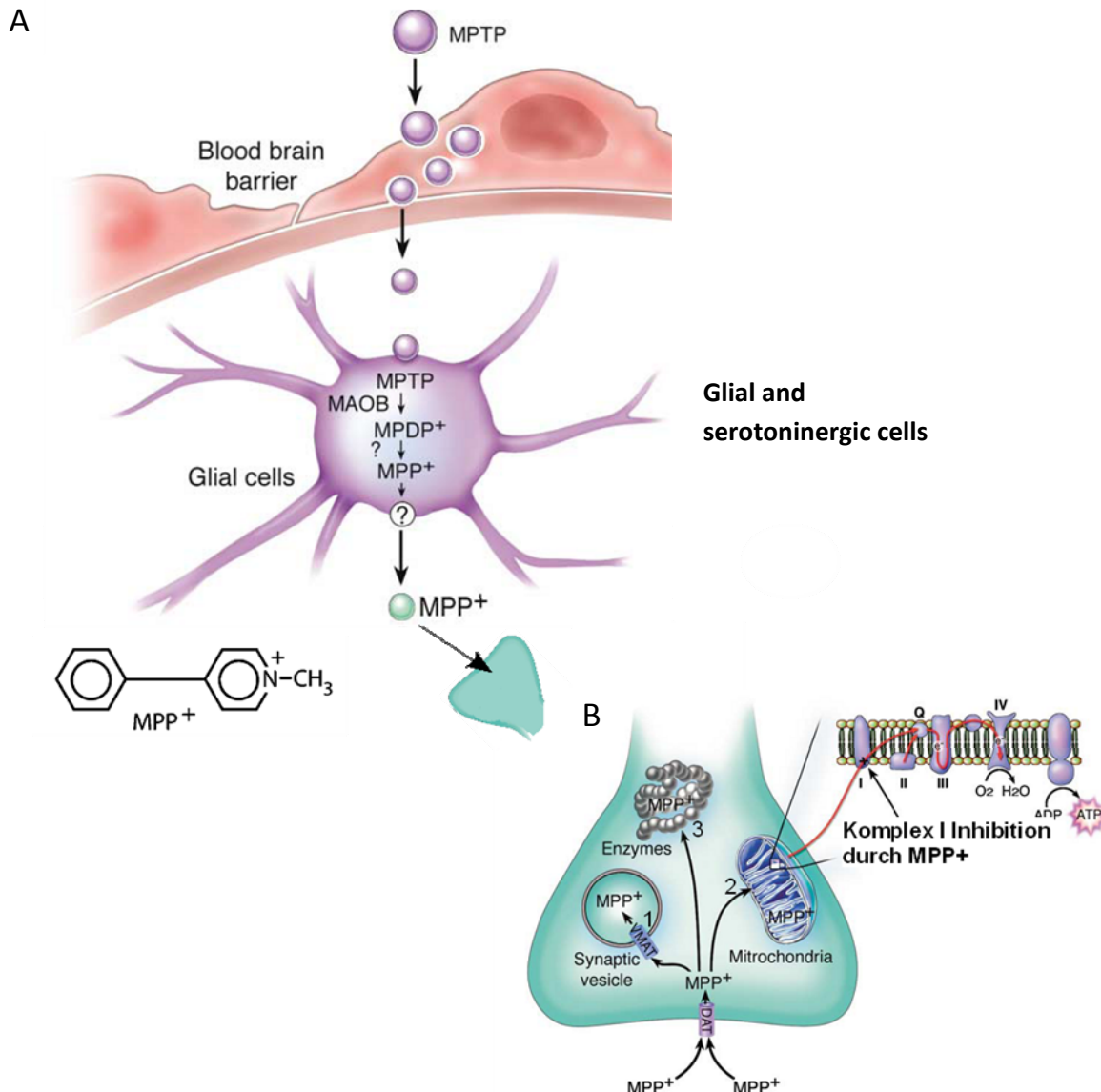


Abb. 6 Schematische Darstellung des MPTP-Metabolismus

**A**

Nach systemischer Gabe von MPTP (s.c. oder i.p.) passiert das lipophile MPTP die Blut-Hirn-Schranke (Blood brain barrier). In Glia- und serotoninergen Zellen wird MPTP von dem Enzym MAO B zu  $MPDP^+$  umgewandelt.  $MPDP^+$  geht über einen unbekanntem Mechanismus in  $MPP^+$  über und wird ebenfalls über einen unbekanntem Mechanismus aus den nicht-dopaminergen Glial cells ausgeschleust. Extrazelluläres  $MPP^+$  wird von dopaminergen Zellen selektiv über den Dopamin-Transporter (DAT) aufgenommen.

**B**

Nach der Aufnahme über den DAT kann  $MPP^+$  (1) über den vesikulären Monoamin-Transporter (VMAT) in synaptische Vesikel aufgenommen werden, (2) in das Mitochondrium aufgenommen werden oder (3) mit zytosolischen Enzymen reagieren. Die Aufnahme von  $MPP^+$  in Vesikel schützt die Zelle vor der Toxinwirkung. (2) und (3) stellen die toxischen Wege dar. Im Mitochondrium blockiert  $MPP^+$  die mitochondriale Atemkette durch Komplex I-Inhibition. Es wird weniger ATP gebildet und mehr reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) entstehen.

**(Quelle: Dauer & Przedborski 2003, modifiziert)**

Die Parkinson-typische Beeinträchtigung des Proteasoms (mit der Folge, dass fehlgefaltete Proteinaggregate im Zytosol auftreten) konnte für MPTP-Toxinmodelle erst von Fornai und Kollegen festgestellt werden (Fornai et al. 2005). Sie zeigten die für Parkinson so typischen  $\alpha$ -synuclein-haltigen Einschlusskörperchen in den dopaminergen SN-Neuronen. Durch die chronische-systemische Gabe des MPTP mittels osmotischer Pumpe konnten Parkinson-ähnliche Verhaltensänderungen bei den Mäusen erzeugt werden und es bildeten sich die typischen Einschlusskörperchen, die aufgrund von Beeinträchtigungen des Proteasoms hervorgerufen wurden. Die systemische MPTP-Applikation via osmotischer Pumpe erzeugte stabile MPP<sup>+</sup>-Spiegel im Striatum bis zu 21 Tagen. Dagegen lösten sporadische MPTP-Injektion kurzweilige MPP<sup>+</sup>-Peaks mit bis zu 5-fach höheren Werten aus. Es wurden die neurotoxischen Auswirkungen der sporadischen MPTP-Injektion mit der kontinuierlichen Applikation verglichen. Hervorzuheben ist, dass man bei der kontinuierlichen Gabe ebenso wie bei der sporadischen einen Verlust TH-positiver SN-Zellen um bis zu etwa 80% auslösen konnte. Dies konnte von Alvarez-Fischer und Kollegen nicht wiederholt werden (Alvarez-Fischer et al. 2008). Trotz ähnlichem Versuchsaufbau konnte mit kontinuierlicher MPTP-Applikation via osmotischer Pumpe weder ein Verlust TH-positiver SN-Zellen noch ein Auftreten  $\alpha$ -synuclein-haltiger Einschlusskörperchen ausgelöst werden. Die Kombination mit Probenecid und sporadische MPTP-Injektionen dagegen lösten einen Verlust TH-positiver SN-Zellen aus. (Probenecid ist ein Stoff, der den Organischen Anionen Transporter 1 in der Niere hemmt und somit die Ausscheidung organischer Anionen hemmt. Dies fördert die Ausscheidung von Harnsäure, weswegen die Substanz als Gicht-Medikament verwendet wird.) Sie untersuchten die Mäuse außerdem auf das Parkinson-typische Symptom einer Gliazell-mediierten chronischen Infektion. Es konnte keine Mikroglia-Reaktion auf das Protokoll der chronischen MPTP-Applikation via osmotischer Pumpe festgestellt werden.

Das Einführen der Implantation osmotischer Pumpen ersparte den Tieren die Belastung und den Stress wiederholter MPTP-Injektion. Intermittierende MPTP-Injektionen (s.c oder i.p.) haben den großen Nachteil systemischer Nebenwirkungen auf Grund intermittierend hoher Toxinkonzentrationen. Zu diesen Nebenwirkungen zählen vor allem ausgeprägte



Hypokinesien mit der Gefahr begleitender Hypothermien sowie ein ebenfalls nach Injektion auftretendes plötzliches Herzversagen.

Das von uns gewählte PD-Modell verzichtete vollkommen auf eine systemische Applikation des Parkinsontoxins 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,4-Tetra-Hydropyridin (MPTP), sondern der aktive Toxin-Metabolit, das 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium-Ion (MPP<sup>+</sup>) wurde mittels einer chronisch implantierten Kanüle direkt intraventrikulär (icv) appliziert. MPP<sup>+</sup> wurde chronisch und kontinuierlich mittels einer ebenfalls implantierten osmotischen Pumpe verabreicht, wodurch auch hohe Toxin-Konzentrationen im Gehirn, die in Folge von MPTP-Injektionen entstehen, vollkommen vermieden wurden. Entsprechend wurden systemische kardiovaskuläre und zentrale hypokinetische Nebenwirkungen der bisherigen Parkinson-Modelle dramatisch reduziert.

Ein weiterer entscheidender Vorteil ist die Tatsache, dass das verwendete 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium-Ion (MPP<sup>+</sup>) im Gegensatz zum MPTP die Blut-Hirn-Schranke beim Mensch oder Versuchstier nicht passieren kann. Dies erhöht entscheidend die Sicherheit dieses Parkinson-Mausmodells für die beteiligten Wissenschaftler, Tierpfleger und technischen Assistenten. Die Gefahren einer unbeabsichtigten, zentral wirksamen Intoxikation, wie sie bei MPTP Verwendung drohen, wurden so für alle Beteiligten ausgeschlossen.

Yazdani und Kollegen etablierten ein vergleichbares Modell erfolgreich bei Ratten (Yazdani et al. 2006).

## 1.5 Ziel

Ziel des Versuchsvorhabens war es, ein verbessertes, chronisch-neurotoxikologisches Mausmodell des Morbus Parkinson (PD) zu etablieren. Dieses verbesserte Parkinson-Modell sollte sich durch eine geringere körperliche Belastung und ein reduziertes Stressniveau für die Versuchstiere auszeichnen und sollte entsprechend während des Versuchsverlaufes durch eine niedrigere Mortalität gekennzeichnet sein. Zusätzlich bestand für die am Versuch beteiligten Personen keine mit einer MPTP-Intoxikation vergleichbare Gefahr.

Gleichzeitig sollte es die klinischen und pathologischen Charakteristika des Morbus Parkinson (PD) beim Menschen besser nachbilden:

- Selektiver und progressiver Verlust dopaminerger Neurone
- Neurodegeneration in anderen betroffenen Hirnarealen (wie Locus coeruleus, anteriore olfaktorische Strukturen, lower brain stem areas)
- ähnliche pathophysiologische Mechanismen neuronaler Degeneration (oxidativer Stress, mitochondrialer Komplex I-Defekt)
- Auftreten  $\alpha$ -synucleinhaltiger Einschlusskörperchen im Zytosol (Lewy bodies)
- Parkinson-typische motorische Störungen, die auf L-Dopa ansprechen

Letzteres ist entscheidend, um die Mechanismen des noch ungeklärten Mechanismen des Zelltodes dopaminerger Neuronen bei Morbus Parkinson aufklären zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1 Versuchstiere



**Abb. 7 C57Bl/6-Maus von Charles River (Sulzfeld, D)**

**Die 38 männlichen Versuchstiere waren im Durchschnitt 77,5 Tage  $\pm$  2,89 Tage alt. Sie wurden zu zweit in Standardkäfigen (Euronorm II: 370 cm<sup>2</sup> Grundfläche) gehalten. (Quelle: [www.criver.com](http://www.criver.com))**

Alle Versuchstiere waren männliche Mäuse des Stammes C57Bl/6 (Charles River, Sulzfeld, D.). Die 38 Versuchstiere waren zu Versuchsbeginn durchschnittlich  $77,5 \pm 2,9$  Tage alt. Die Tiere wurden im 12 h-Lichtrhythmus gehalten (8.00 bis 8.30 Uhr Morgendämmerung, Tag bis 20.00 Uhr, 20.00 bis 20.30 Uhr Abenddämmerung). Futter und Wasser bekamen die Tiere ad libitum. Die Tiere wurden zu zweit in Standardkäfigen (Euronorm II: 370 cm<sup>2</sup> Grundfläche) gehalten und zwei Mal pro Woche in saubere Käfige umgesetzt. Nach ihrer Ankunft von Charles River hatten die Tiere mindestens eine Woche Zeit sich an die Haltungsbedingungen und ihre Partnertiere zu gewöhnen. Die Tiere wurden zu zweit in einem Käfig gehalten, um soziale Deprivation bedingt durch lange Einzelhaltung zu verhindern. Die Trennung vom Partnertier während und nach operativen Eingriffen konnte dank Isofluran-Narkose auf maximal wenige Stunden begrenzt werden. So entstanden keine Trennungs-assoziierten Rangordnungskämpfe. Die Tiere verfügten über eine Papprolle pro Käfig und Papiertücher standen als Beschäftigung/Versteckmöglichkeit/Nestbau über die gesamte Länge des Versuchs zur Verfügung.

## 2.1.2 Lösungen

### Lösungen zur Pumpenfüllung:

Artificial Cerebrospinalfluid (ACSF) (Harvard Apparatus, Holliston, MA, US)

1-Methyl-4-Phenylpyridinium iodide (MPP<sup>+</sup>) (Sigma-Aldrich, München, D)

Dosis 1): 0,03 mg/kg/d MPP<sup>+</sup> (0,1 µg MPP<sup>+</sup>/ µl ACSF )

Dosis 2): 0,1 mg/kg/d MPP<sup>+</sup> (0,34 µg MPP<sup>+</sup>/ µl ACSF)

Dosis 3): 0,3 mg/kg/d MPP<sup>+</sup> (1,07 µg MPP<sup>+</sup>/ µl ACSF)

Es wurden zur Füllung einer Pumpe 500 µl einer Lösung mit den jeweiligen Konzentration aus einer Stocklösung hergestellt.

### Perfusions-Lösung:

4% Paraformaldehyd und 15% Pikrinsäure in PBS (Phosphat buffered saline: 0,05 mol/L Phosphat-Puffer; 0,0135 mol/L Kaliumchlorid; 0,685 mol/L Natriumchloride; pH 7,4 bei 25°C)

### Aufbewahrungs-Lösung:

PBS-Lösung mit 10% Saccharose und 0,05% Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)

### Lösungen der Immunhistochemie (DAB/ABC-Reaktion):

Block-Lösung: 10% Pferde-Serum (Vector Laboratories, Burlingame, USA),  
0,2% Bovines Serum-Albumin (Vector Laboratories, Burlingame, USA),  
0,5% Triton X-100 in PBS

Carrier-Lösung: 1% Pferde-Serum (Vector Laboratories, Burlingame, USA),  
0,2% Bovines Serum-Albumin (Vector Laboratories, Burlingame, USA),  
0,5% Triton X-100 in PBS

DAB-Lösung: 0,4% DAB, 0,2% NiCl<sub>2</sub>-Lösung, 0,2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris (DAB Substrate Kit for Peroxidase, Vector)

PBS: 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4

Tris-Puffer: 50 mM Trizma<sup>®</sup> Base in aqua dest. (Millipore-Anlage)

### 2.1.3 Enzyme/Antikörper

Enzym:	Meerettichperoxidase (Vectastain® ABC Kit, PK-4001, Vector Laboratories, Burlingame, USA), Verdünnung 1:1000
Primärer Antikörper:	Anti-Tyrosinhydroxylase, Spezies: Kaninchen, (Merck, Darmstadt, D), Verdünnung 1:1000
Sekundärer Antikörper:	Biotinylierter Sekundär-Antikörper, Spezies: Ziege (Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA), Verdünnung 1:1000

### 2.1.4 Osmotische Pumpe und Brain Infusion Kit (BIK)

Für die Versuche wurden die osmotische Pumpen des Modells 2004 und das Brain Infusion Kit 3 von Alzet, CA, USA verwendet.

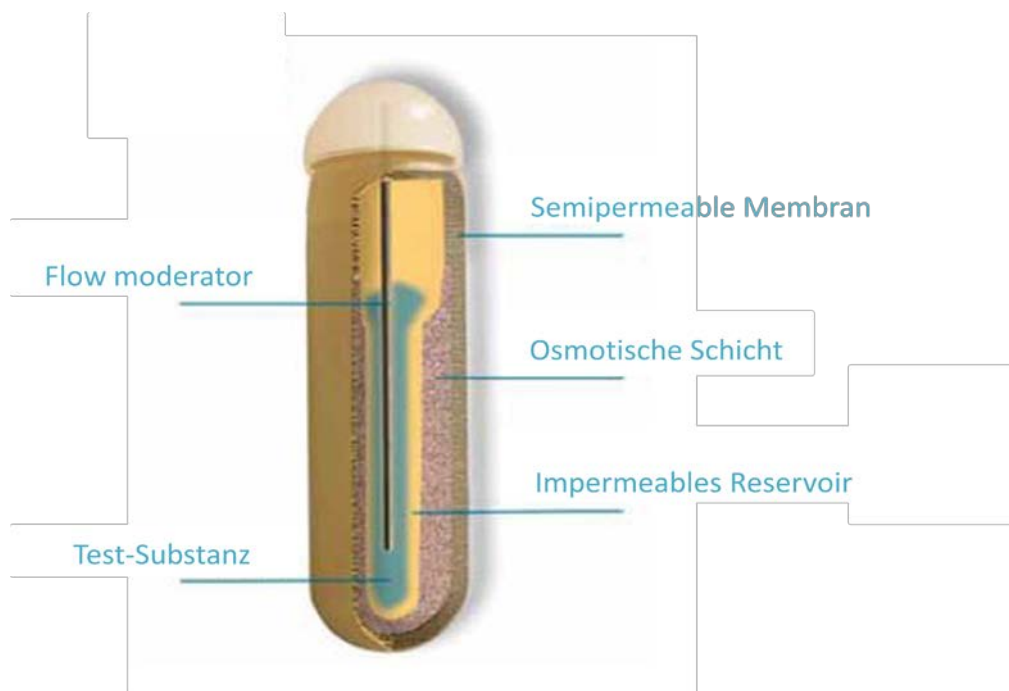


Abb. 8 Schema einer osmotischen Pumpe mit Flow moderator

Die äußerste Schicht der Pumpe ist eine semipermeable Membran, die ein Eindringen von Gewebeflüssigkeit in die darunter gelegene osmotische Schicht ermöglicht. Die salzhaltige osmotische Schicht nimmt – sobald sie in ein Tier eingesetzt ist - durch das allmähliche Eindringen von Gewebeflüssigkeit stetig an Volumen zu. Dadurch wird das Reservoir, das die Test-Substanz enthält und von einer impermeablen Membran umgeben ist, kontinuierlich entleert. Über den Flow moderator tritt die Test-Substanz aus. (Quelle: [www.alzet.com](http://www.alzet.com))

Die Füllkammer der Pumpe ist mit einer impermeablen Membran umgeben, die wiederum von einer Salzkammer umgeben ist. Diese osmotisch aktive Schicht ist nach außen mit einer semipermeablen Membran umschlossen. Das Eindringen von Gewebeflüssigkeit des Tieres wird somit ermöglicht und die osmotische Schicht nimmt kontinuierlich an Volumen zu, wodurch die Füllkammer allmählich über den Flow Moderator entleert wird (Abb. 8).

Die Pumpe Model 2004 hat ein Füllvolumen von 200  $\mu\text{l}$ , eine Laufzeit von 28 Tagen und eine Flussrate von 0,25  $\mu\text{l}$  / Stunde bei 37° C. Sie ist 3 cm lang und hat einen Durchmesser von 0,7 cm.

Das BIK 3 setzt sich zusammen aus dem Katheterschlauch (Catheter Tube), der Kanüle (Cannula) und den Tiefen-Justierungs-Platzhaltern (Depth-Adjustment Spacers).

Der Katheterschlauch besteht aus medizinischem Polyvinylchlorid und ist ca. 15 cm lang. Er hat einen Außendurchmesser von 1,14 mm ( $\pm 0.08$ ) und einen Innendurchmesser von 0.69 mm ( $\pm 0.08$ ). Im Verlauf der Operation wurde der Schlauch auf ca. 2-3 cm gekürzt, bevor er mit der Anschlussstelle der Kanüle (Cannula) verbunden wurde.

Der Kanüle sitzt ein Plastikzylinder (Tab) auf, der eine Einziehung hat, an der der Zylinder abgetrennt wurde. Er diente der exakten Fixierung der Kanüle an der stereotaktischen Apparatur. Nach dem Abtrennen lag die runde (5,9 mm Durchmesser) Kopfplatte dem Schädel auf. Aus der Kopfplatte ragte die 3 mm lange Metallkanüle senkrecht nach unten und im 90° Winkel zur Seite die Anschlussstelle für den Katheterschlauch. Die Tiefen-Justierungs-Platzhalter, die die Eindringtiefe in 0,5 mm Schritten modifizierbar machen, wurden nicht benötigt, da die gesamte Länge der Metallkanüle von 3 mm benötigt wurde (Abb. 9 und 10).

Die osmotische Pumpe wurde 2 Tage vor der Implantation mit dem Katheterschlauch verbunden, mit den jeweiligen Lösungen gefüllt (siehe 2.1.2) und durch 40-stündige Inkubation bei 37° C gestartet. ([www.alzet.com](http://www.alzet.com))

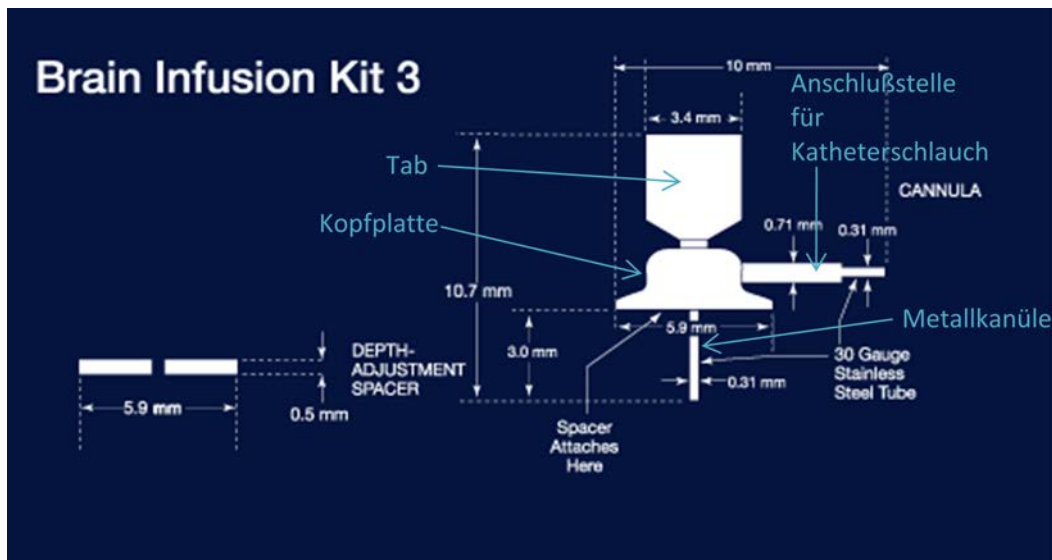


Abb. 9 Darstellung der Maße der Kanüle (Cannula) des Brain Infusion Kits 3

Die Kanüle setzt sich zusammen aus einem Plastikzylinder (Tab), der Kopfplatte, der Anschlussstelle für den Katheterschlauch und der Metallkanüle. Der Plastikzylinder diente der Fixierung in der stereotaktischen Apparatur und wurde an seiner Einziehung vor dem Nähen der Haut abgetrennt. Aus der Kopfplatte ragt die aus gehärtetem Stahl bestehende Metallkanüle senkrecht nach unten. Sie war der Teil, der in das Gehirn versenkt wurde -bei diesem Experiment vollständig ohne Verwendung der Tiefen-Justierungs-Platzhalter. Die Anschlussstelle für den Katheterschlauch hat eine innenliegende Stahlkanüle, die von gleicher Beschaffenheit und gleichem Durchmesser ist wie die Metallkanüle. Die innenliegende Metallkanüle ist zu ungefähr  $\frac{3}{4}$  mit einer Polycarbonat-Schicht ummantelt. Auf diese Schicht wurde der Katheterschlauch geschoben.

(Quelle: [www.alzet.com](http://www.alzet.com))

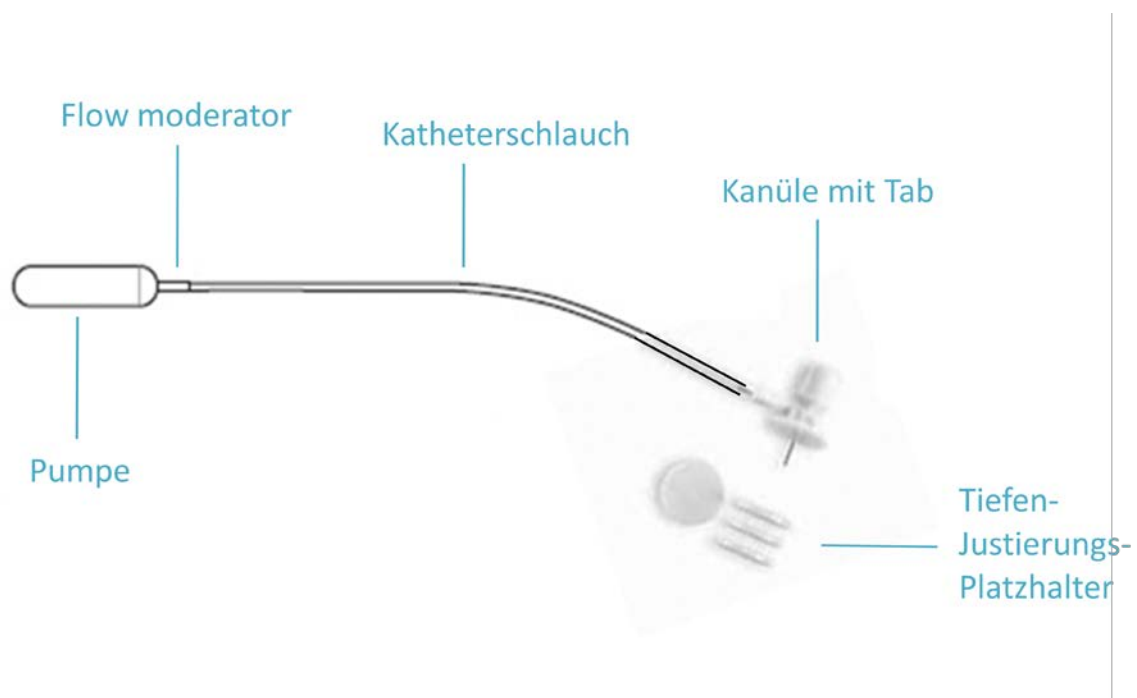


Abb. 10 Darstellung einer Osmotischen Pumpe mit über Flow moderator angeschlossenem Katheterschlauch und Kanüle mit Tab.

Die Tiefen-Justierungs-Platzhalter, die der Regulierung der Eindringtiefe der Metallkanüle dienen, sind mit dargestellt, wurden aber nicht benötigt.

(Quelle: [www.alzet.com](http://www.alzet.com), modifiziert)

## 2.2 Methoden I: Pumpenimplantation

### 2.2.1 Narkose und Analgesie

Die analgetische Versorgung erfolgte 1 h präoperativ mit Carprofen (Rimadyl, Pfizer, Berlin, D, 5 mg/kg KGW s.c.). Die Tiere erhielten 20 Minuten vor Operationsbeginn eine Prämedikation mit Atropin (0,5 mg/kg i.p., Atropinsulfat, B.Braun, Tuttlingen, D) Die Narkose erfolgte inhalativ mit einem Isofluran- (Forene, Abbott, Wiesbaden, D) Sauerstoff-Gemisch (Einleitung in Box: 2,25 Vol% Isofluran, Erhaltung: 1,4-1,6 Vol% Isofluran, Sauerstoff: 0,35 L/Min). Vorteile dieser Narkose sind die gute Steuerbarkeit und die rasche Erholung postoperativ. Während der Narkose wurden die Tiere medizinisch überwacht (Atmung, Spontanbewegungen, Cornea-Reflex, Tiefenschmerz-Prüfung im Zwischenzehen-Bereich, Farbe des Blutes). Unter Narkose wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte gelagert (Einstellung: 41° C, rektal gemessener Körpertemperatur  $37,5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$  C). Die Cornea wurde vor Austrocknung mit Augensalbe geschützt. Es wurde keimarm gearbeitet (Haut- und Umgebungsdesinfektion, sterile Abdeckung, Handschuhe etc.).

### 2.2.2 Einsetzen der Pumpe

Es wurde ca. 0,75 cm lang rechts der Medianen in Höhe der Schulter die Haut inzidiert und mit einer Arterienklemme (Baby-Moskito, 9,5 cm, gerade, anatomisch) eine Unterhaut-Tasche seitlich entlang der Wirbelsäule für die Pumpe stumpf präpariert. Nach dem Einsetzen der Pumpe in die Rückentasche mit dem aufgesetzten und gefüllten Katheter kopfwärts gerichtet wurde ca. 1,25 cm lang längs der Medianen beginnend an den Ohren fast bis Augenhöhe inzidiert. Von dort wurde ebenfalls mit der Arterienklemme subkutan zu der Inzision an der Schulter präpariert und der Katheter nach vorne geführt. Der Hautschnitt an der Schulter wurde nun vernäht (Prolene 6-0, Nadel C-1 von Ethicon, Norderstedt, D).



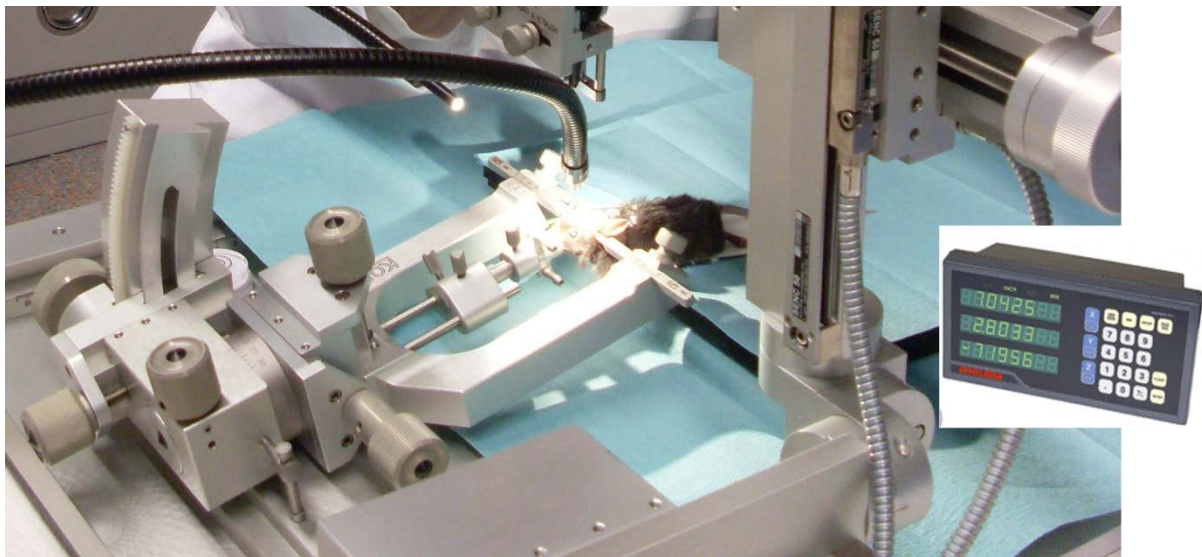
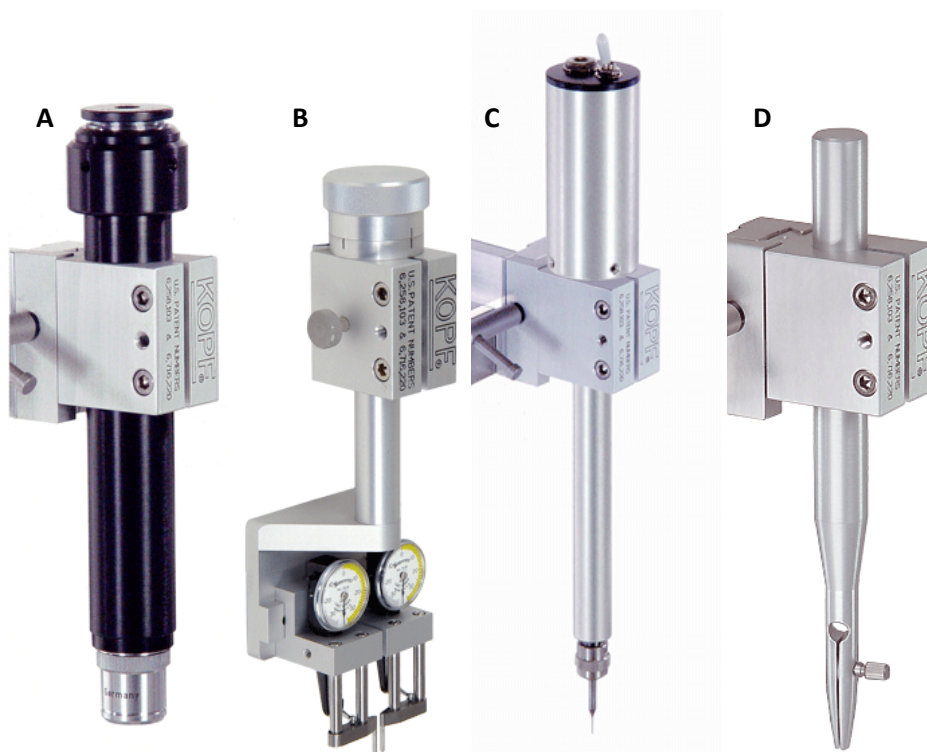


Abb. 11 Maus intraoperativ eingespannt in die stereotaktische Apparatur (Model 1900 und Zubehör, DKI)

Die über der Maus in den Mikro-Manipulator (Model 1940, DKI) eingespannten Instrumente (zum Teil am oberen Bildrand zu sehen) wurden -nach erfolgter Justierung der X (lateralen)- und Y (anterior-posterioren)-Achsen- auf die exakten Koordinaten für das Bohrloch in 3 Ebenen (X-,Y- und Z-Achse) eingestellt. Am rechten Bildrand ist das Display des Mikro-Manipulators abgebildet. Es gibt die Werte der 3 Achsen wieder.

(Quelle: [www.kopfinstruments.com](http://www.kopfinstruments.com))



### **Abb. 12 Verwendete Stereotaktische Instrumente der Model-Reihe 1900 von DKI**

**A Mikroskop (Centering Scope 40x, Model 1915, DKI)**

**B Stereotaktischer Ausrichtungs-Indikator (Stereotaxic Alignment Indicator, Model 1905, DKI)**

**C Bohrmaschine ( Stereotaxic Drill, Model 1911, DKI)**

**D Kanülenhalter (Cannula Holder, Model 1966, DKI)**

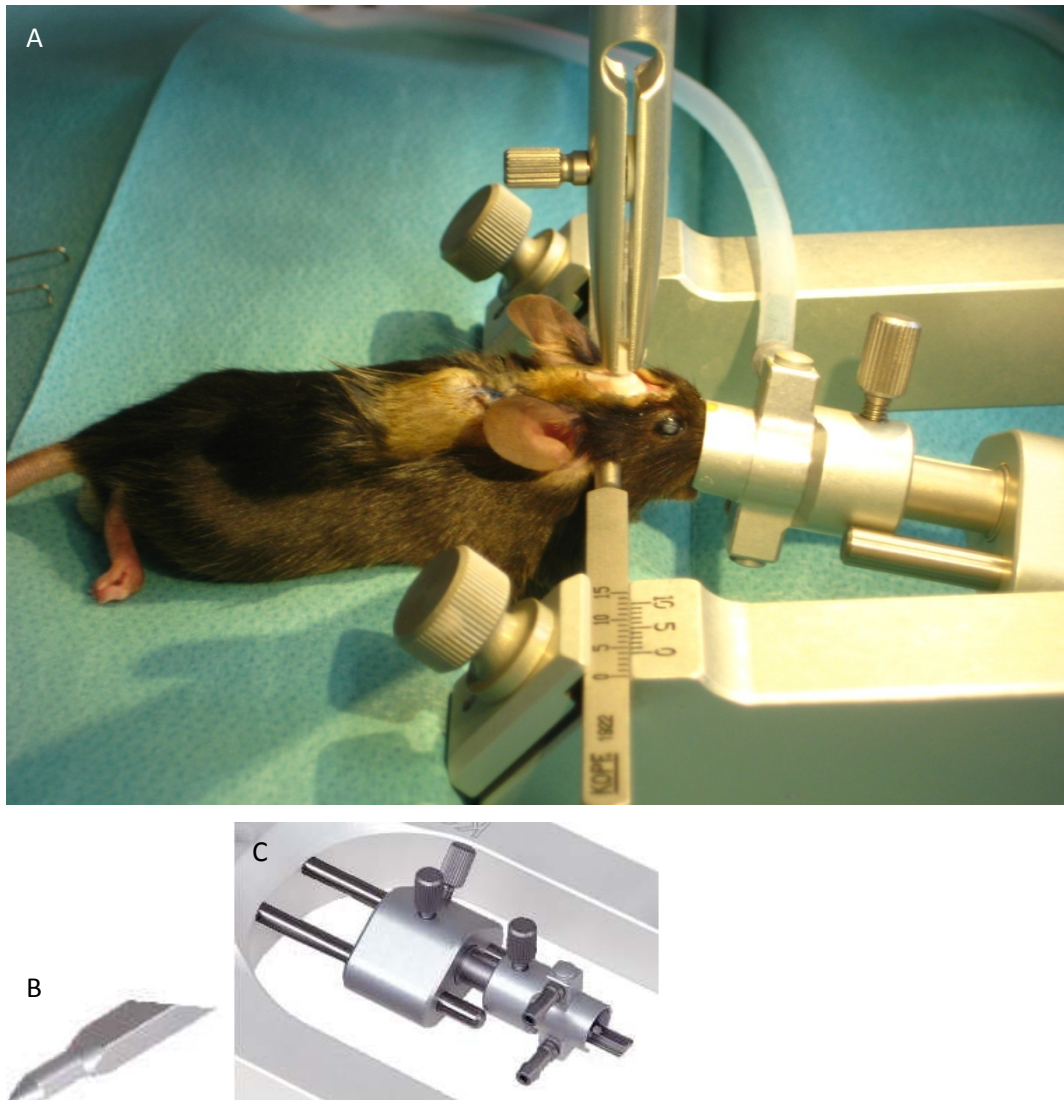
(Quelle: [www.kopfinstruments.com](http://www.kopfinstruments.com))

### **2.2.3 Stereotaxie**

Nach dem Einsetzen der Pumpe wurde die Maus in den Narkose-Kopf-Halter (Mouse Gas Anesthesia Head Holder, Model 1923-B, DKI, Abb. 13 C) und die seitlichen Kopffixierungen der stereotaktischen Apparatur eingespannt (Abb. 13 A und B). Der Mikromanipulator der stereotaktischen Apparatur (Stereotactic Alignment System, Micro Manipulator, Model 1940, DKI) ist der in 3 Ebenen über Drehräder einstellbare Instrumentenarm über dem Kopf der Maus. Er ist mit einem justierbaren Display verbunden, das die Werte der X, Y- und Z-Achse wiedergibt. In den Hautschnitt am Kopf wurde ein Wundspretzer eingebracht. Unter Verwendung des in den Instrumenten-Halter des Mikromanipulators eingespannten Mikroskops (40fache Vergrößerung, Centering Scope, Model 1915, DKI, Abb. 12 A) wurde in der Mitte des Koordinaten-Kreuzes des Mikroskops Bregma (anteriorer Kreuzungspunkt der Schädelnähte) aufgesucht und die im Display des Mikro-Manipulators abgebildeten Werte der 3 Achsen auf 0 gestellt. Treffen sich die 2 Schädelnähte nicht in einem Kreuz, sondern ist der Verlauf der coronaren Schädelnaht versetzt, wurde die gedachte Mitte des Verlaufs als Kreuzungspunkt verwendet. Im nächsten Schritt wurde Lambda (posteriorer Kreuzungspunkt der Schädelnähte) aufgesucht, das sich auf der Y (anterior-posterior)-Achse 4.0 bis 4.6 mm posterior Bregma befindet. Auf Höhe der Mitte zwischen Bregma und Lambda auf der Y-Achse erfolgte die Justierung der Neigungen des Kopfes in der anterior-posterioren und latero-lateralen Ebene unter Verwendung des Stereotaktischen Ausrichtungs-Indikators (Stereotaxic Alignment Indicator, Model 1905, DKI, Abb. 12 B). Mit dem wieder eingespannten Mikroskop wurde Bregma nochmals aufgesucht und gegebenenfalls noch mal korrigiert und auf 0 gestellt. Die Koordinaten für das Bohrloch betragen Koordinaten X (laterale-Achse): 0,9 mm und Y (anterior-posteriore)-Achse: 0,1 mm. Die Schädeloberfläche wurde mit einem abgerundeten Spatel aufgeraut und mit einem

Tropfen Histoacrylkleber (Histoacryl, Gewebekleber aus Enbucrilat, Aesculap, Tuttlingen, D) versehen. Dies lieferte eine trockene, raue Oberfläche, die für das spätere Festkleben der Kopfplatte der Kanüle benötigt wurde. Die Bohrmaschine (Drilling Unit, Model 1911, Abb. 12 C) mit dem eingespannten Bohrer (Durchmesser 0,45 mm) wurde in den Arm des Stereotakten eingespannt und die knöchernen Schädeldecke durchbohrt (300 µm). Nach der Blutstillung wurde die Kopfkanüle in den Kanülenhalter (Cannula Holder, Model 1966, DKI, Abb. 12 D) eingespannt und mit dem Katheterschlauch verbunden. Die Kopfplatte der Kanüle (Abb. 9) wurde an ihrer Basis mit Cyanoacrylatkleber (Loctite 454 Sofortklebstoff, D) bestrichen und 2,9 mm tief koordinatengenau entlang der Z-Achse in den lateralen Ventrikel geführt (Abb. 13 A). Zur endgültigen Fixierung wurden noch kleine Tropfen des Flüssig-Kunststoffs Palladur (Zahntechnischer Kunststoff, Heraeus, Hanau, D) am Übergang Kanüle/Schädeloberfläche aufgetragen. Anschließend musste der Kunststoff 15 Minuten aushärten.

Nach Abschneiden des Plastikzylinders (Tab) auf der Kanüle wurde die Oberfläche der Kanüle nochmals mit einem Tropfen Palladur versehen, um die Oberfläche zu glätten. Nach dem Trocknen des Kunststoffs wurde der Kopfhaut-Schnitt mit U-Heften vernäht (Prolene 6.0, Ethicon, New Jersey, USA).



**Abb. 13 A** Nahaufnahme der Maus intraoperativ eingespannt in die stereotaktische Apparatur (Model 1900 und Zubehör, DKI)

Der Kopf der Maus ist rechts und links am Ohrgrund fixiert mit den Ohr-Fixierungs-Hilfen (Ear Bars with 45° Non Rupture Tip with 0,8 mm radius, Model 1955, DKI, Abb. B). Der Kopf ist weiterhin über den Narkose-Kopf-Halter (Mouse Gas Anesthesia Head Holder, Model 1923-B, DKI, Abb. C) fixiert. Der Narkose-Kopf-Halter ermöglicht außerdem die Versorgung des Tieres mit dem Narkosegas-Sauerstoff-Gemisch (Abb. A: Es ist der am Narkose-Kopf-Halter fixierte Narkosegas-Sauerstoff-Gemisch-Schlauch sichtbar). Der Katheterschlauch ist bereits mit der Kanüle verbunden. Der Plastikzylinder (Tab) der Kanüle wurde in den Kanülenhalter (Cannula Holder, Model 1966, DKI) eingespannt. Dies ermöglichte das exakte Positionieren der Kanüle auf dem Schädel/ im Gehirn der Maus.

(Quelle: [www.kopfinstruments.com](http://www.kopfinstruments.com))



**Abb. 14 Maus unmittelbar nach erfolgter Pumpen- und BIK-Implantation**

### **2.2.4 Postoperative Versorgung**

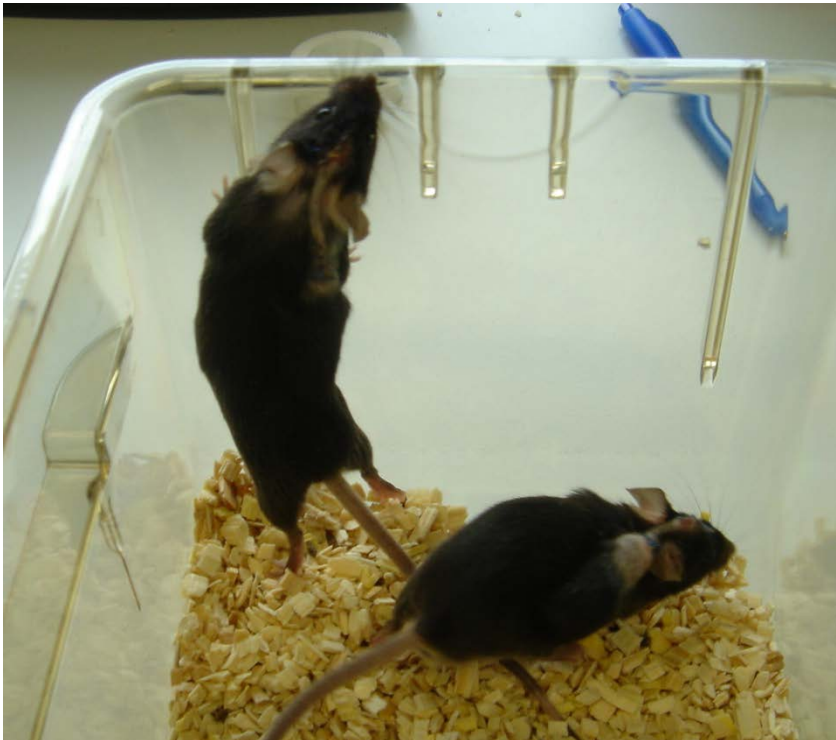
Bereits während des Nähens des Hautschnittes am Kopf wurde die Narkosegas-Zufuhr auf 1-1,2 Vol% reduziert. Der Zeitraum zwischen dem Trennen von der Narkosegas-Zufuhr zu dem Zeitpunkt an dem die Tiere wieder wach waren und normales Verhalten zeigten, betrug etwa 15 bis 45 Minuten. Die Tiere wurden in dieser Zeit auf einem Wärme-Knick-Kissen (The Heat Solution, Prism Enterprises LP, USA) mit 2 Lagen Zellstoff zwischen Tier und Kissen gelagert. Nach Wieder-Erlangen normaler Verhaltensweisen (Exploration/Aufrichten, Fressen, Putzen) wurden die Tiere wieder zu ihrem Partnertier gesetzt. Dies lief ohne neue Rangordnungs-Kämpfe zwischen den männlichen Tieren ab, da die Trennung-Zeit maximal 3 h betrug. Die Mehrzahl der Tiere war wieder nach ca. 2 h zurück bei ihrem Partnertier.

Die Tiere erhielten postoperativ zur Vorbeugung einer Wundinfektion über ca. 1 Woche das Antibiotikum Enrofloxacin ins Trinkwasser (Baytril 2,5% Orale Lösung, Bayer, Leverkusen, D, Dosierung: täglich 0,2-1 ml pro 100 ml Trinkwasser).

4 Wochen lang wurden die Tiere nur zum Käfig-Reinigen (2 x/Woche), zum Wiegen (1 x/Woche) und zur Beurteilung des Gesundheitszustandes (Beobachten des Verhaltens,

Haut/Fell, der Wundnaht und Sitz der Pumpe) gestört. Öffnen des Käfigs für Kontrollen und Herausnehmen der Mäuse zum Wiegen oder Spritzen wurden über die gesamte Versuchslaufzeit mit der Gabe von Haferflocken kombiniert. Dies führte zu einer gewissen Gewöhnung an den Menschen, was den Stress der Tiere minimierte. Die zu zweit gehaltenen Tiere betrieben gegenseitige Fellpflege im Bereich der Nähte, was zu einem Fellverlust in diesem Bereich führte, aber bei keinem Tier zu einer Naht-Dehiszenz führte. Bei 15% der Tiere kam nach 1 bis 2 Wochen postoperativ die mit Palladur überzogene Kopfkanüle durch die Haut durch. Es entstanden keine Entzündungen der Haut oder Abstoßungsreaktionen. Problematisch für den Versuch war, dass bei einem Teil der Tiere mit freiliegender Kopfkanüle die Partnermaus an der Anschlussstelle Katheterschlauch/Kanüle nagte. Dies wurde täglich überwacht. Bei nur 2 Tieren eröffnete die Partnermaus das Pump-System. Diese Tiere wurden aus dem Versuch herausgenommen.

Es traten bei keiner Maus Verletzungen durch Rangordnungskämpfe auf. Von den 19 Paaren konnte nur bei einem Paar vermehrtes Kämpfen untereinander und hektische Reaktionen beim Umgang mit den Tieren beobachtet werden. Dieses Paar wurde nicht für die Auswertung verwendet. Die Maus-typischen Bewegungsabläufe (Laufen, Putzen, Aufrichten etc.) und Futter- und Wasseraufnahme waren von Anfang an ungestört durch die Pumpe (Abb. 15). 2 der 10 Dosis 3)-Tiere wirkten ruhiger/langsamer in ihren Bewegungen als die anderen und 3 Dosis 3)-Tiere drehten sich 3-8 Tage post-operativ beginnend häufiger nach rechts als nach links. Die Tendenz beim Laufen häufiger nach rechts als nach links abzubiegen hielt 1 bis 3 Wochen an. 5 der 38 Mäuse litten unter plötzlich auftretendem Gewichtsverlust, was bei 2 der Tiere wahrscheinlich auf Blutungen aus dem Bohrloch zurückzuführen war. 3 davon wurden noch während der Versuchslaufzeit euthanasiert und keine von ihnen in die Auswertung eingebracht. 1 Tier starb bei einem OP-Zwischenfall. Die übrigen 32 Mäuse zeigten kontinuierliche Gewichtszunahme unbeeinflusst von Narkose und Operation.



**Abb. 15** Zwei Partner(C57/Bl6)-Mäuse mit implantierter Pumpen/BIK

Die zu zweit gehaltenen Tiere waren in ihren Maus-typischen Bewegungsabläufen nicht gestört durch die Implantation der Pumpe/BIK. Trotz gegenseitiger Fellpflege im Bereich der Wund-Nähte kam es bei keinem der Tiere zu einer Naht-Dehiszenz. Da die Tiere schon mindestens 1 Woche zusammen unter den gleichen Bedingungen wie im Versuch zusammen saßen, gab es während des Versuchs keine neuen Rangordnungskämpfe. Das paarweise Halten der sozialen Tiere verminderte Stress und soziale Deprivation.

Nach Ende der 4-wöchigen Laufzeit musste die Pumpe explantiert werden, da dann die exakte Pump-Rate nicht mehr gewährleistet war. Außerdem durfte dieses Modell laut Hersteller nicht länger als 6 Wochen in der Maus verbleiben, da die Pumpe aufgrund ihrer osmotischen Funktionsweise ihr Salzreservoir entleeren könnte.

Dies wurde wie unter 2.2.1 beschrieben unter Isofluran-Narkose mit Atropin als Prämedikation und Carprofen als Analgesie durchgeführt.

Über einen Hautschnitt wurden die Pumpen entfernt, die Kopfkanüle und ein Teil des Katheterschlauchs verblieben im Tier. Der Katheterschlauch wurde kopfwärts mit Cyanoacrylatkleber verschlossen. Die Haut wurde vernäht.

Nach Pumpen-Explantation wurden die Mäuse unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bisher noch weitere 4 Wochen gehalten. Am Ende der 4 Wochen wurden sie in tiefer

Narkose perfundiert, um ihrer Gehirne für das Schneiden und die weitere Aufarbeitung zu fixieren.

## 2.3 Methoden II: Histologie und Immuncytochemie

### 2.3.1 Perfusion und Präparation

Die Perfusion mit Perfusions-Lösung (4% Paraformaldehyd und 15% Pikrinsäure in PBS) dient der dauerhaften Fixierung der nativen Proteinstrukturen des zu untersuchenden Gewebes. Sie wurde im Zustand völliger Areflexie (Tiefenschmerz-Prüfung im Zwischenzehenbereich, Cornea-Reflex) nach Injektion einer Narkose-Überdosis (100 µl Natrium-Pentobarbital i.p.; Eutha®77, Essex Tierarznei, München, D) durchgeführt. Nach Fixation der Maus auf einer Styroporunterlage wurde ein Hautschnitt im Thoraxbereich angelegt. Die Brusthöhle wurde eröffnet, die Aorta descendens abgeklemmt und Heparin (50 µl Heparin-Natrium ; 250 I.E., Liquemin®, Roche, D) in das noch schlagende Herz injiziert. Das Abklemmen der Aorta descendens verhindert die vollständige Perfusion der Maus. Das Heparin wirkt einer intravasalen Blutgerinnung entgegen. Die Perfusions-Nadel wurde ebenso wie die Heparin-Injektion in den noch schlagenden linken Ventrikel geschoben. Über den angeschlossenen Perfusions-Lösung-Kreislauf wurde nun die 4° C kalte Perfusions-Lösung (siehe 2.1.2) unter konstantem Druck (ca. 10,5 ml/ Min.) in das Gefäßsystem der Maus mindestens 4 Minuten lang appliziert. Der rechte Vorhof wurde eröffnet, um das Abfließen des venösen Blutes zu ermöglichen. Man erkannte eine erfolgreiche Perfusion an der allmählichen Gelbfärbung der Haut und einer Versteifung des vorderen Teils der Maus. Nach erfolgter Perfusion wurde der Kopf abgetrennt, das Gehirn aus dem Schädel heraus präpariert und über Nacht bei 4° C in Perfusions-Lösung eingelegt. Dies diente einer zusätzlichen Fixierung. Danach wurde das Gehirn bis zur weiteren Verwendung in eine Aufbewahrungslösung (siehe 2.1.2) bei 4° C gelagert, die Bakterien- und Pilz-hemmend wirkt.



### 2.3.2 Antikörperreaktion und ABC/DAB-Färbung

Siehe auch 2.1.2 Lösungen und 2.1.3 Enzyme/Antikörper

Die perfundierten Gehirne wurden in einen Schneideblock gelegt, der eine für ein Mäusegehirn passende Vertiefung hat und koronare Schlitze hat. Die Schlitze ermöglichen, mit einer Rasierklinge rechtwinklige koronare Schnitte durch das Gehirn anzulegen. Die Gehirne wurden in 3 Teile geteilt. Für den Versuch wurden der mittlere (die SN enthaltende) Block und der rostrale (das Striatum enthaltende) Block benötigt. Diese beiden Blöcke wurden mit einem Mikrotom in 30-100 µm dünne Scheiben geschnitten (Mikrotom Leica VT 1000 S, Speed: 4,2, Frequenz: 8, Schnittdicke: 100 µm Striatum, 30 µm Mittelhirn), die in mit PBS gefüllten Gläsern gesammelt wurden. Von der rostralen Pons, Mesencephalon und kaudalem Hypothalamus wurden 30 µm dicke koronale Hirnschnitte angefertigt (caudal bei Bregma -3,88 mm beginnend bis Bregma -2,92 mm), die das komplette dopaminerge Mittelhirnsystem mit seinen Kernen A8 (Retrorubrales Areal), A9 (SN), A10 (VTA) enthielten. Ebenfalls wurden Serien von 100 µm dicken koronalen Schnitten durch das Telencephalon angefertigt, die das gesamte Striatum mit seinen Arealen Nucleus caudatus, Putamen und Nucleus accumbens enthielten (Bregma -0,34 mm bis Bregma 1,78 mm). Anschließend wurden die Schnitte 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen. Unspezifische Bindungen von Antikörpern wurden mit einer Blockierungs-Lösung (Pferde-Serum und Bovines Serum-Albumin, siehe 2.1.2) verhindert, in der die Schnitte eine Stunde inkubiert wurden. Nach einmaligem Spülen mit PBS wurden die Schnitte nun über Nacht mit dem Primär-AK verdünnt in Trägerlösung (Carrier, siehe 2.1.2 Lösungen) bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert. Das in Blockierungs- und Carrier-Lösung enthaltene Triton X-100 dient als Detergenz und ermöglicht durch eine erhöhte Gewebespermeabilität die komplette Penetration der Antikörper und anderer Makromoleküle in die 30 µm bzw. 100 µm Hirnschnitte.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen, bevor sie für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rüttler mit dem Sekundär-AK (siehe 2.1.3) in Carrier inkubiert wurden. Der verwendete Sekundär-AK ist ein am C-terminalen Ende mit Biotin konjugierter AK. Das Biotin ist Bindungsstelle für die darauffolgende ABC-Reaktion. Um die Stamm-Lösung für die ABC-Reaktion herzustellen wurden die Komponente A (Avidin) und Komponente B (Meerrettichperoxidase konjugiert mit Biotin) in PBS (1:1000)

eine Stunde vor Beginn der ABC-Reaktion hergestellt (Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Nach der Inkubation mit dem Sekundär-AK wurde erneut 3 x 10 Minuten gespült. Nun wurden die Schnitte in der ABC-Stamm-Lösung eine Stunde lang auf dem Rüttler inkubiert. Dabei fand eine Kopplung der Peroxidase über das Avidin am biotinylierten Sekundär-AK statt. Anschließend wurden die Schnitte 2 x 10 min in PBS und 1x 10 Minuten in Tris-Puffer gewaschen.

Um die TH-Immunreaktivität zu visualisieren, wurde die DAB-Färbung durchgeführt (Nickel-intensivierte Diaminobenzidin-Reaktion). Das primär farblose 3,3'-Diaminobenzidin wurde über einen Oxidationsvorgang in eine braune Form überführt. Dazu mussten die Schnitte in der DAB-Stammlösung bestehend aus 0,4% DAB, 0,2%  $H_2O_2$  und 0,2%  $NiCl_2$  für 3 Minuten inkubiert werden. Die DAB-Stamm-Lösung wurde unmittelbar vor der Inkubation hergestellt und sofort nach den 3 Minuten mit Tris-Puffer abgestoppt werden. Das  $H_2O_2$  in Verbindung mit der Peroxidase bewirkte eine Oxidation des Diaminobenzidins und das Nickelchlorid diente der Signalverstärkung und lokalen Präzipitation. Nachdem 3 x 10 Minuten in Tris-Puffer gewaschen wurde, wurden die Schnitte auf gelatinisierte Objektträger (76 x 26 mm geschnitten, Mattrand, Knittel Gläser) aufgezogen und anschließend über Nacht trocknen gelassen. Am nächsten Tag konnten die Objektträger mit den Schnitte, nach stattgefundener Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 2 x 100% Ethanol, jeweils 10 min) und 2 x 10 Minuten Inkubation in 100% Xylol, mit VectaMount® (Vector Laboratories, Burlingame, USA) und Deckgläsern (24 x 60 mm Menzel Gläser) eingedeckelt werden. Nach erfolgter Trocknung konnten die Schnitte am Mikroskop (Olympus BX61) ausgewertet werden.

## 2.4 Methoden III: Stereologische Quantifizierung

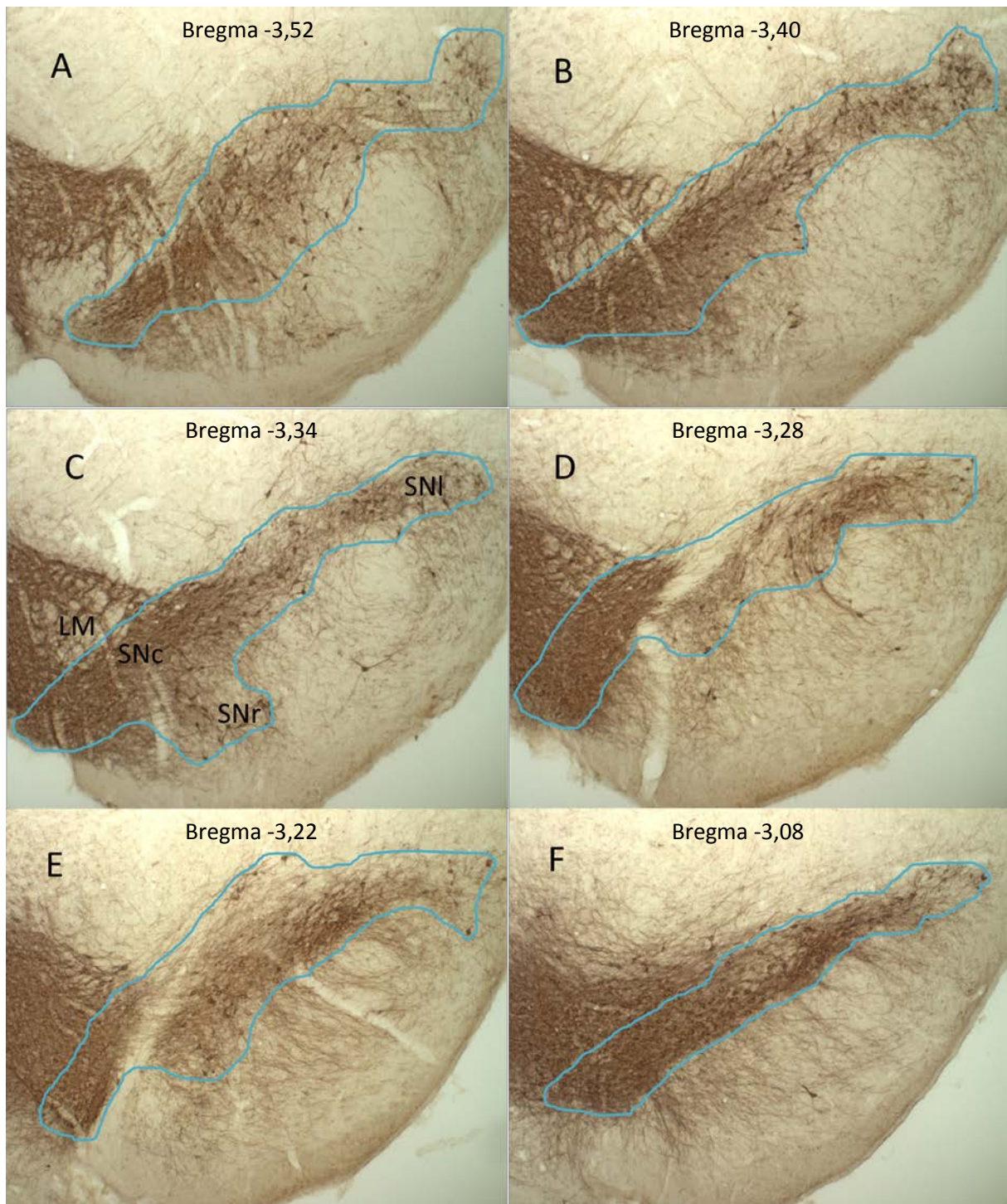
### 2.4.1 StereoInvestigator-Analyse

Die StereoInvestigator-Analyse wurde angewendet, um die Anzahl der dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra zu quantifizieren. Dies geschah mit Hilfe der StereoInvestigator-Software (Version 5.0, MicroBrightField, Colchester, USA), einer digitalen Kamera, einem PC mit Bildschirm (Pentium 4, Hewlett-Packard), einem Lichtmikroskop

(Olympus BX61) und einem über eine Kontrollstation für das jeweilige Objektiv geeichten xy-step Motor.

Die Substantia nigra pars compacta (SNc), pars reticulata (SNr) und pars lateralis (SNI) wurden anhand anatomischer Kriterien (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second Edition, George Paxinos/Keith B. J. Franklin, 2001) bestimmt und als auszuwertende Region markiert (region of interest). Sie wird auch als counting area bezeichnet (siehe Abb. 16).

Es wurden die ROIs der 30 seriellen TH/DAB-gefärbte SN-Schnitten (siehe 2.3.2) zwischen Bregma -3,88 mm und Bregma -2,92 mm von jedem Tier einseitig ausgewertet. Die caudale Grenze zwischen SNc und VTA wird durch den Lemniscus medialis gebildet (Abb. 16 A). Der Lemniscus medialis verschwindet allmählich weiter rostral. Solange er noch zu erkennen ist, wurde eine gedachte Linie gezogen, um VTA von SNc abzugrenzen (Abb 16 B, C, D, E). Weiter rostral besteht keine klare Abgrenzung mehr zwischen SNc und VTA. Dort wurde eine Verlängerung der von lateralen kommenden oberen Grenze der SNI/SNc als Abgrenzung zur VTA verwendet (Abb. 16 F). Um die Zellzahl TH-positiver dopaminerger Neurone pro Tier zu ermitteln wurde die stereologische Methode des optical fractionator (West et al. 1991, Keuker et al. 2001) angewendet (Abb. 17).



**Abb. 16 A bis F** Koronale Mittelhirnschnitte durch die Substantia nigra mit markierter region of interest (ROI), Verlauf von caudal nach rostral

30  $\mu\text{m}$  dicke koronale Mittelhirnschnitte einer C57Bl/6 Maus nach TH/DAB-Färbung. Die region of interest wird auch als counting area bezeichnet und ist die stereologisch zu quantifizierende Region. Die stereologische Analyse bezieht sich auf die ROI von 30 SN-Schnitten pro Tier zwischen Bregma -3,88 mm und Bregma -2,92 mm auf einer Seite. Sie umfasst TH-positive Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNc), Substantia nigra pars reticulata (SNr) und Substantia nigra pars lateralis (SNI) (siehe Abb. B). Der Bereich zwischen der Ventral tegmental area (VTA) und der Substantia nigra (SN) zeigt nur wenig TH-positive Neurone und wird Lemniscus medialis (LM) bezeichnet. Der LM wurde als anatomische Grenze zwischen VTA und SNc verwendet. Er verschwindet allmählich weiter rostral. In A trennt der LM VTA und SN noch durchgehend, auf Bild F ist er komplett verschwunden.

## 2.4.2 Optical Fractionator

Die Analyse-Methode optical fractionator ist eine Kombination aus dem optical dissector (West et al. 1991) und dem fractionator (Gundersen 1986). Ein optical dissector ist ein dreidimensionaler Kubus innerhalb der ROI (Abb. 17 A). Er stellt die von der Software erstellte Stichprobe dar, in der die TH-positiven Neurone gezählt werden.

Die Oberfläche des optical dissectors wird als counting frame bezeichnet, innerhalb dessen nach festgelegten Regeln gezählt wird (Abb. 17 A). Unter dem Mikroskop stellt der counting frame die Aufsicht auf den optical dissector dar (Abb. 17 B).  $h$  ist die Höhe des optical dissectors, unter dem Mikroskop läuft sie entlang der Tiefen-Achse Z. Zum Zählen TH-positiver Neurone wird der Schnitt entlang der Tiefen-Achse abgesucht. Die obere Grenze wird für jeden Schnitt neu eingestellt. Das Programm zeigt dann mit Hilfe von Symbolen und einem Tiefen-Achsen-Fenster den zu zählenden Bereich entlang der optical dissector Höhe  $h$  an. Oberhalb und unterhalb der optical dissector Höhe  $h$  wird eine guard zone eingefügt. Dies verhindert, dass ein Neuron in zwei aneinandergrenzenden Dissektoren zwei Mal gezählt wird. Die Höhe und die Höhe der guard zone wurden dem Programm vorgegeben. Es dürfen nur Zellen gezählt werden, die innerhalb des counting frames liegen. Schneiden die Zellsomata die rote Linie (rejection line) des counting frame, werden sie nicht gezählt. Die Zellsomata, die auf der grünen Linie (acceptance line) liegen, wurden gezählt. Die Markierung erfolgt per Mausklick mit Markern. Es dürfen nur Zellen gezählt werden, deren Nucleolus beim Auf- und Ab-Fokussieren entlang der optical dissector Höhe  $h$  erscheint oder deren scharfe Darstellung des Zellsomas innerhalb des optical dissectors möglich ist.

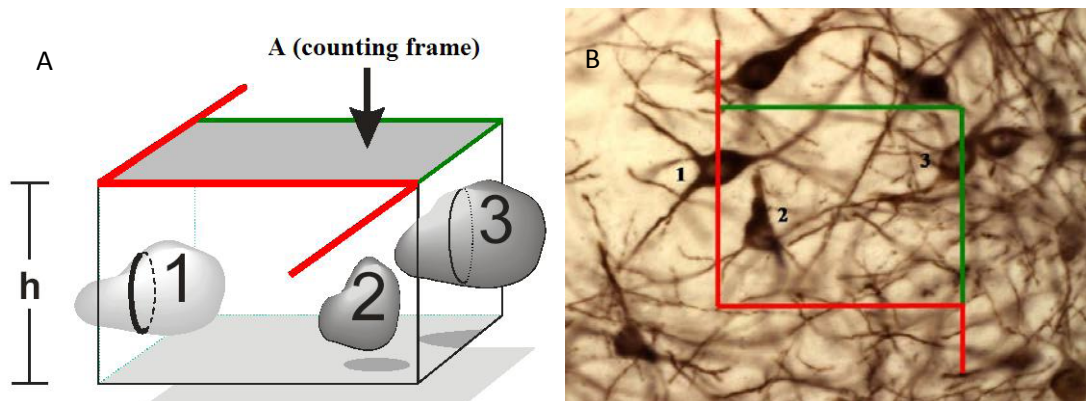


Abb. 17

**A:** Schematische Darstellung eines optical dissectors als dreidimensionaler Kubus.  $h$  ist die Höhe des optical dissectors. A (counting frame) ist definiert als die Oberfläche des optical dissectors.

(Quelle: Keuker et al. 2001, modifiziert von Lammel 2004)

B: Abbildung der zweidimensionalen Aufsicht unter dem Mikroskop auf den optical dissector (counting frame) (Quelle: Lammel 2004)

A+B: 1, 2, 3 sind Neurone im Bereich des optical dissectors, die die Zählregeln verdeutlichen. 1 schneidet die rote Linie (rejection line) und wird nicht mitgezählt, 2 liegt komplett innerhalb des counting frame und wird mitgezählt, 3 liegt auf der grünen Linie (acceptance line) und wird auch mitgezählt.

Die fractionator-Methode gewährleistet eine systematische Verteilung der optical dissectors über die gesamte ROI (Abb. 18). So wird nicht die gesamte ROI ausgewertet werden, sondern nur ein Teil von ihr.

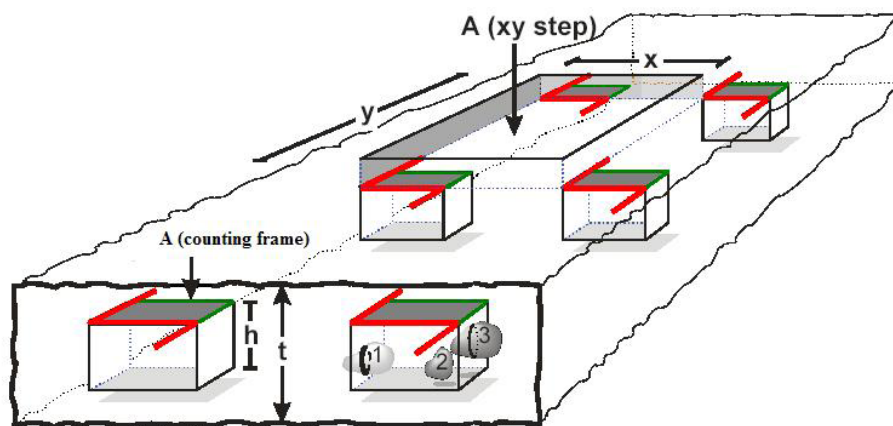


Abb. 18 Schematische Darstellung eines Hirnschnittes mit systematisch verteilten optical dissectors

Die 6 dargestellten Dissektoren sind systematisch über die ROI des Schnittes verteilt.  $x$  und  $y$  sind die Koordinaten, die den Abstand der einzelnen Dissektoren zueinander beschreiben.  $[A (xy \text{ step})]$  beschreibt demnach die genaue Position der Dissektoren.  $h$  ist die Dissektorhöhe,  $t$  die Schnittdicke.  $[A (\text{counting frame})]$  stellt die Dissektor-Oberfläche dar, sie ist der counting frame. (Quelle: Keuker et al. 2001, modifiziert)

Die StereoInvestigator-Software schätzt die Gesamtanzahl der Objekte  $N$  (z.B. TH-positive Neurone) (estimated cells) aus der Summe der pro Schnitt gezählten Zellen  $\sum Q_i$  (counted cells), aus der Fraktion der Schnittfläche (area sampling fraction, **asf**), der Fraktion des Schnittes (section sampling fraction, **ssf**) und der Fraktion der Schnittdicke (thickness sampling fraction, **tsf**):

$$N = \sum Q_i \times \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{tsf}$$

**ssf** ist die Fraktion des Schnittes, d.h. die angewendete Zähl-Frequenz. In diesem Fall wurde jeder 2. Schnitt gezählt, wodurch  $ssf = \frac{1}{2}$  beträgt. Mit welchem Schnitt begonnen wird, wird zufällig vorgegeben.

**asf** beschreibt das Verhältnis der Flächen des counting frames [A (counting frame)] und des optical dissector [A (xy step)] zueinander.

**tsf** ist das Verhältnis der Höhe der optical dissector-Höhe **h** zur realen Schnittdicke **t**.

Die reale Schnittdicke **t** wurde für jedes Tier repräsentativ über die Gesamtlänge der caudorostralen Achse durch Fokussieren von der Oberkante bis zur Unterkante des Schnittes unter Verwendung eines 60× Öl-Immersion-Objektivs bestimmt. D.h. bei 8 Schnitten der 30 SN-Schnitte wurden 5-6 Messungen auf der rechten Seite durchgeführt. Diese wurden gemittelt.

### 2.4.3 Fehlerabschätzung (coefficient of error) nach Gundersen

Der sogenannte coefficient of error (**CE**) oder Gundersen-Wert wird zur statistischen Bewertung der geschätzten Gesamtzellzahl benötigt. Ein CE von  $\leq 0,05$  ist erstrebenswert für einen aussagekräftigen Versuch. Nach dem Gundersen-Wert richtet sich demnach die Entscheidung, in welchem Zählintervall vorgegangen werden kann. Die StereoInvestigator-Software rechnet nach folgender Formel:

$$CE = \sqrt{\frac{[3 \times (\sum_{i=1}^n Q_i^2 - \sum_{i=1}^n Q_i) + \sum_{i=1}^{n-1} (Q_i \times Q_{i+1}) - 4 \times \sum_{i=1}^{n-2} (Q_i \times Q_{i+2})] + \sum_{i=1}^n Q_i}{240 \sum_{i=1}^n Q_i}}$$

**i** Index für die Nummer des Schnittes

**n** Anzahl der Schnitte

**$Q_i$**  Anzahl gezählter Zellen auf einem Schnitt,

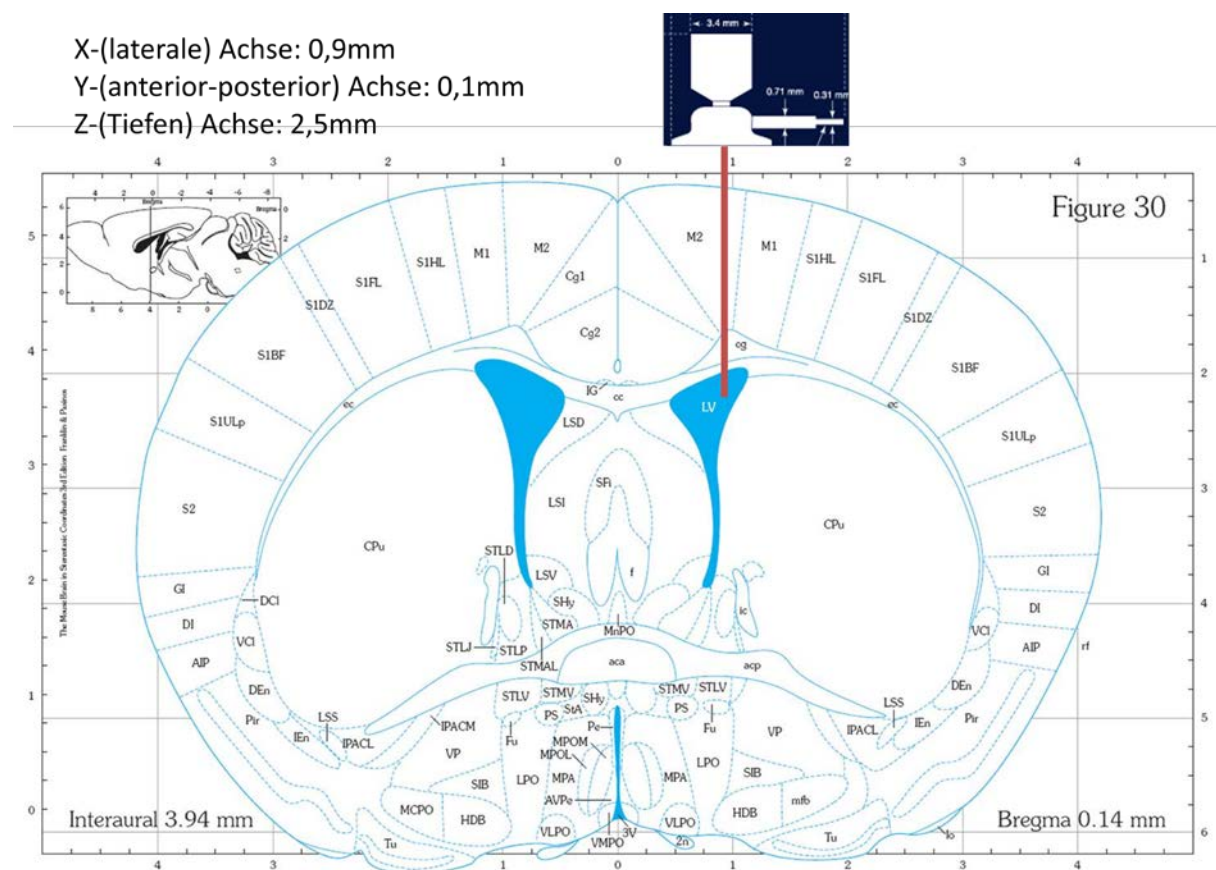
**$Q_{i+1}$**  Anzahl gezählter Zellen auf dem  **$Q_i$**  folgenden Schnitt

**$Q_{i+2}$**  Anzahl gezählter Zellen auf dem übernächsten Schnitt nach  **$Q_i$**

(Quelle: Keuber et al. 2001, modifiziert)

## 2.5 Methoden IV: Optische Dichte-Messung

Es wurde jeder 2. Schnitt der 100  $\mu\text{m}$  koronaren Striatum-Schnittserie für die optische Dichte-Messungen der TH-Immunreaktivität verwendet. Mit Hilfe des unter 2.4.1 beschriebenen Mikroskops, des PCs, der StereoInvestigator-Software und der digitalen Kamera wurden Bilder der Telencephalon-Schnitte im Bereich des Striatums (siehe 2.3.2) angefertigt. Zur Graustufen-Analyse wurden 6 Bilder rund um die Implantationsstelle der Applikationskanüle in den lateralen Ventrikel verwendet. Die Koordinaten der Implantation der Applikationskanüle waren bei Bregma 0,14 mm (siehe Abb. 19).



**Abb. 19** Schematische Abbildung des Telencephalons bei Bregma 0,14 mm (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second Edition, George Paxinos/Keith B. J. Franklin, 2001). Ein Schema des Brain Infusion Kits (BIKs 3, siehe 2.1.4) und die Implantations-Koordinaten der Applikationskanüle des BIKs 3 wurden hinzugefügt.

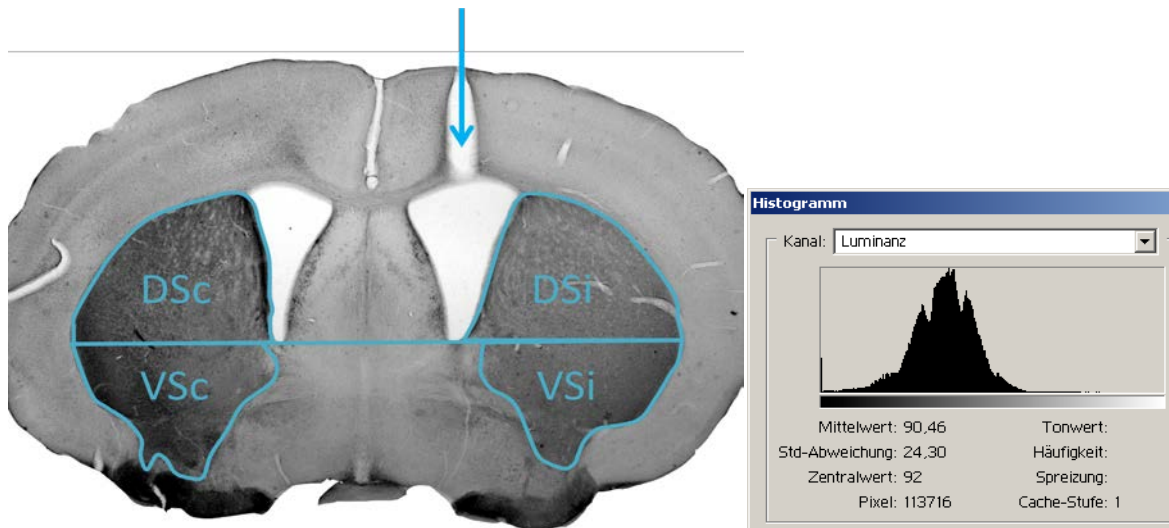
Es ist die Implantation der Applikationskanüle in den lateralen Ventrikel dargestellt.



Zur Graustufen-Analyse wurde das Programm Photoshop (Adobe, Version 7.0) verwendet. Zuerst wurden die aufgenommenen RGB-Bilder zu Graustufen-Bildern reduziert, dann unter Verwendung des Magnet-Lassos in 4 auszuwertende Bereiche eingeteilt. Zur Orientierung wurden Geraden angelegt, die dorsales und ventrales Striatum voneinander trennen. So entstanden 4 Quadranten pro Schnitt: ipsi-lateral zur Läsion, dorsal und ventral, und contra-lateral zur Läsion, ebenfalls dorsal und ventral. Das dorso-laterale Striatum stellt den sensorischen Projektionsort der SN dar. Der medio-ventrale Anteil bestehend aus dem Nucleus accumbens und Teilen des olfaktorischen Tuberkels wird zusammen gefasst als limbischer Projektionsort bezeichnet (enthält Projektion u.a. aus dem Hippokampus, Amygdala, Präfrontalem Kortex und serotoninerger Bahnen). Eine histologisch oder immunhistochemisch definierte Grenze zwischen dorsalem und ventralem Striatum existiert nicht (Björklund & Dunnett 2007, Vorn et al. 2004). Die angelegten Geraden erlauben jedoch eine Unterscheidung einer primär dorsalen bzw. ventralen axonalen Schädigung des Striatums.

Für jeden dieser 4 Quadranten wurde mittels der Histogramm-Funktion die Grauwert-Verteilung bestimmt (Abb. 20). Das Histogramm-Fenster gibt den Mittelwert der Grauwert-Verteilung ( $X$ ) an, dessen Standard-Abweichung und einen Zentralwert. Dieser Mittelwert  $X$  (zwischen 1 und 255) wurde für die Optische Dichte-Messung verwendet. Je heller der Kortex-Bereich war, desto höher war der Graustufen-Mittelwert. Daher wurden die finalen Werte mit der Operation  $(255 - X)$  bestimmt.

Um alle Schnitte und alle Tiere miteinander vergleichen zu können wurde von jedem Schnitt eine  $100 \times 100$  Pixel großer Bereich im Kortex analysiert. Dieser Graustufen-Wert wurde von allen auf diesem Schnitt gemessenen Werten subtrahiert. Somit konnten Abweichungen der Werte aufgrund von unterschiedlicher Beleuchtung oder Färbung minimiert werden. Die so erhaltenen 6 Werte pro Quadrant und Tier wurden nun zusammen gefasst und gemittelt (siehe 3.2 Ergebnisse).



**Abb. 20** Graustufen-Bild eines koronaren 100 µm dicken und TH/DAB-gefärbten Telenzephalon-Schnittes mit geöffnetem Histogramm-Fenster (Adobe Photoshop, Version 7.0)

Dargestellt ist die Aufteilung in die vier Striatum-Quadranten: dorsales Striatum contra-lateral (DSc) Ventrales Striatum contra-lateral (VSc), dorsales Striatum ipsi-lateral (DSi) und ventrales Striatum ipsi-lateral (VSi). Die Injektions-Stelle (Pfeil) in den Ventrikel ist gut sichtbar (Bregma 0,1mm). Das geöffnete Histogramm-Fenster gibt die Graustufen-Verteilung für den Bereich C wieder. C wurde zuvor mit dem Magnet-Lasso ausgewählt. Die Markierung der Quadranten und der horizontalen Hilfslinie wurde nachträglich zur Verdeutlichung hinzugefügt.

## 2.6 Statistik

Die Messwerte der Maus-Hirnschnitte wurden in einer Mittelwertbestimmung in den Dosis-Gruppen (Dos1), (Dos2) und (Dos3) und der Kontroll-Gruppe ACSF zusammengefasst und zugehörige SEMs angegeben. Bei der Gesamtzellzahlermittlung TH-positiver Substantia nigra-Zellen und der Betrachtung der gezählten Zellen entlang der caudo-rostralen Achse wurde auf die Auswertung der (Dos2) komplett verzichtet. Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen graphpad prism und BMDP. Zur statistischen Beurteilung der Gesamtzellzahlen TH-positiver Substantia nigra-Zellen wurde ein Mittelwertvergleich mit Hilfe der Einfaktoriellen Varianzanalyse und Tukey-Folgetests durchgeführt. Beim Betrachten der TH-positiven Substantia nigra-Zellen entlang der caudo-rostralen Achse wurde eine Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt. Die Optische Dichte wurde mit Hilfe einer Dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen ausgewertet. Die Signifikanz wurde symbolisiert mit Stern-Zeichen (\* für  $P < 0,05$ ; \*\* für  $P < 0,01$ ; \*\*\* für  $P < 0,001$ ).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Stereologische Quantifizierung dopaminerger TH-positiver Substantia nigra-Neurone

Die stereologische Quantifizierung ergab eine Zellzahlerhöhung TH-positiver Zellen mit steigender MPP<sup>+</sup>-Dosierung. Die mittlere Gesamtzellzahl N war in der MPP<sup>+</sup>/Dos3)-Gruppe im Vergleich zur ACSF/Kontroll-Gruppe um ca. 23% erhöht. Eine Tendenz zur Dosis-abhängigen Zellzahlerhöhung ließ sich an der mittleren Gesamtzellzahl der MPP<sup>+</sup>/Dos1)-Gruppe erkennen. Sie lag 12% höher als in der ACSF/Kontroll-Gruppe (Abb. 21). Bei der Gesamtzellahlermittlung TH-positiver Substantia nigra-Zellen und der Betrachtung der gezählten Zellen entlang der caudo-rostralen Achse wurde auf die Auswertung der Dos2) komplett verzichtet (Abb. 21 und Abb. 22).

Die statistische Auswertung der Gesamtzellzahlen der Gruppen ACSF, Dos1) und Dos3) zeigte im globalen Vergleich signifikante Unterschiede (Mittelwertvergleich mit Hilfe der Einfaktoriellen Varianzanalyse; Ergebnis  $p = 0,0363$ ; \* signifikant). Beim paarweisen Vergleich war die ACSF/Kontroll-Gruppe gegen die MPP<sup>+</sup>/Dos3)-Gruppe signifikant unterschiedlich (Tukey-Folgetest; Ergebnis: ACSF/Kontroll-Gruppe vs MPP<sup>+</sup>/Dos3)-Gruppe  $p < 0,05$ ; \*signifikant). Der Vergleich der ACSF/Kontroll-Gruppe gegen die MPP<sup>+</sup>/Dos1)-Gruppe und der MPP<sup>+</sup>/Dos1)-Gruppe gegen die MPP<sup>+</sup>/Dos3)-Gruppe ergab keinen signifikanten Unterschied (Tukey-Folgetests; Ergebnisse nicht signifikant; Abb. 21).

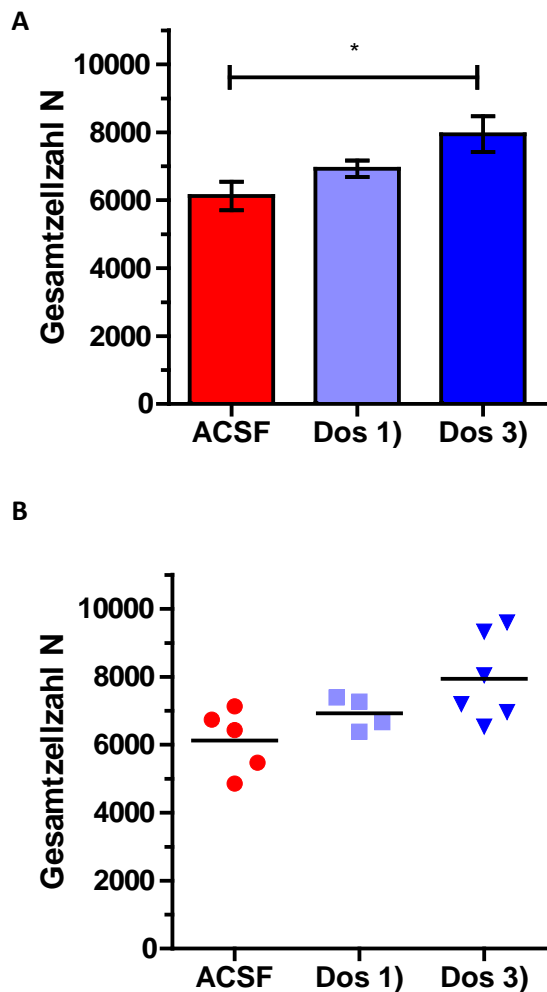


Abb. 21 Graphische Darstellung der Gesamtzellzahlen N (estimated cell number) TH-positiver SN-Zellen von C57Bl/6-Mäusen, die ACSF (n=5), MPP<sup>+</sup>/Dos 1) (n=4) und MPP<sup>+</sup>/Dos 3) (n=6) erhielten

N ist die Gesamtzellzahl der rechten SN-Seite.

A zeigt die Mittelwerte (MW) und ihre Standardfehler (SEM):

ACSF (MW: 6124 ; SEM: 419,9),

Dos 1) (MW: 6925 ; SEM: 240) und

Dos 3) (MW: 7945 ; SEM: 522,4)

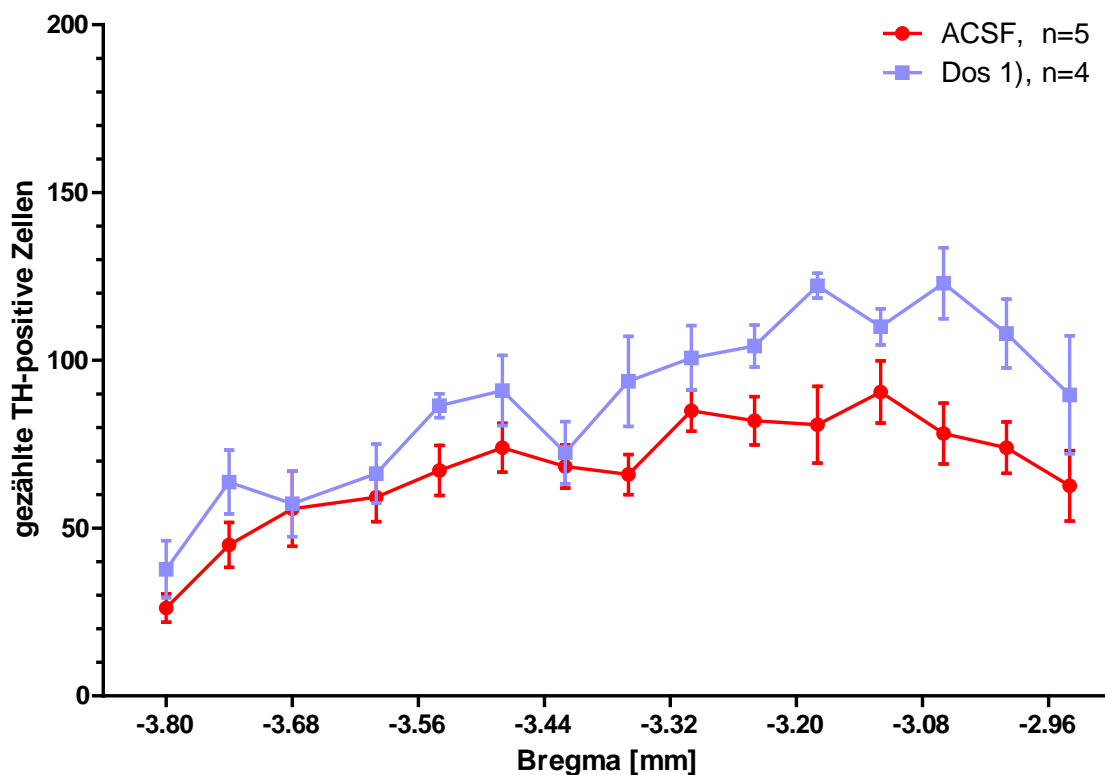
B gibt die Verteilung der einzelnen Tiere um den Mittelwert wieder.

Im globalen Vergleich waren die Gruppen signifikant unterschiedlich (Einfaktorielle Varianzanalyse;  $p=0,0363$ ). Die MPP<sup>+</sup>/Dos 3)-Gruppe wies gegenüber der ACSF/Kontroll-Gruppe mit einer Zellzahlerhöhung um 23% signifikant mehr TH-positive SN-Zellen auf (Tukey-Test;  $p<0,05$ ). Die MPP<sup>+</sup>/Dos1)-Gruppe ließ eine Tendenz zu einer Zellzahlerhöhung mit steigender MPP<sup>+</sup>-Dosierung erkennen (Erhöhung um 12%).

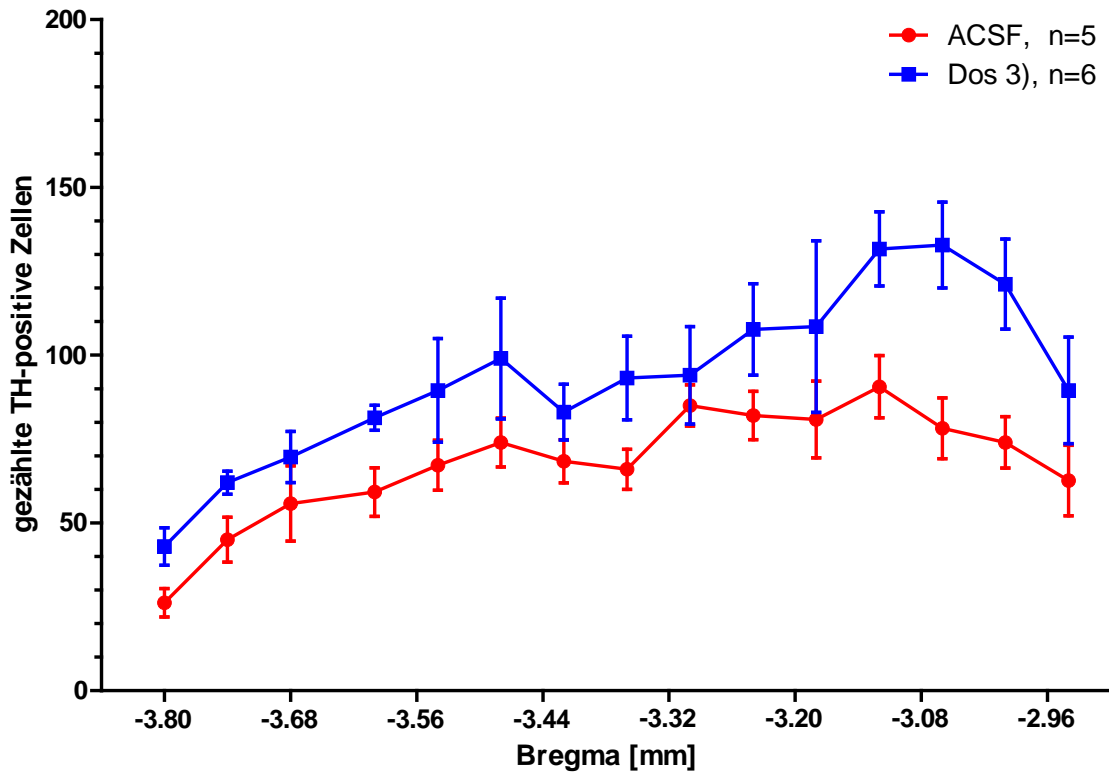
Bei Betrachtung der gezählten TH-positiven SN-Zellen (counted cells) pro Hinschnitt (Section) entlang der caudo-rostralen SN-Achse (Bregma -3,80 mm und Bregma -2,96 mm) konnten ebenfalls signifikante Unterschiede festgestellt werden. Man erkannte eine Zellzahlerhöhung der beiden Dosis-Gruppen entlang der gesamten caudo-rostralen SN-Achse. Diese war in der Dos3)-Gruppe (+ ca. 38%) stärker ausgeprägt als in der Dos1)-Gruppe (+ ca. 31%). Im rostralen Drittel der SN war die Zellzahlerhöhung sowohl in der Dos1)- als auch in der Dos 3)-Gruppe deutlicher ausgeprägt als in den caudalen SN-Anteilen. Die durchschnittliche Zellzahlerhöhung auf den 4 rostralen Schnitten (Bregma -3,12 bis -2,94) betrug ca. 56% in der Dos3)-Gruppe und ca. 40% in der Dos1)-Gruppe im Vergleich zu dem rostralen Bereich der ACSF-Gruppe (Bregma -3,12 bis -2,94). Auf Höhe von Bregma -3,06 hat die durchschnittliche Zellzahlerhöhung der Dos3)-Gruppe (n=6) mit ca. 70% ihr Maximum (Abb. 23).

Zur Auswertung der gezählten TH-positiven Substantia nigra-Zellen entlang der caudo-rostralen Achse wurde eine Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich des Faktors Bregma durchgeführt. Zwischen den 3 Dosis-Gruppen ACSF, Dos1) und Dos3) bestanden globale Unterschiede (Ergebnis:  $p=0,0099$ ; \*\*signifikant). Ebenfalls globale Unterschiede bestanden zwischen den Bregma-Punkten, gemittelt über die Dosen (Ergebnis:  $p<0,0001$ ; \*\*\*signifikant). Eine Wechselwirkung zwischen den Einflüssen von Dosis und Bregma bestand nicht (Ergebnis:  $p=0,93$ ; nicht signifikant); d.h. bis auf zufällige Abweichungen sind die Unterschiede zwischen den Bregma-Punkten statistisch gesehen nicht signifikant abhängig von der Dosis.

A



B



C

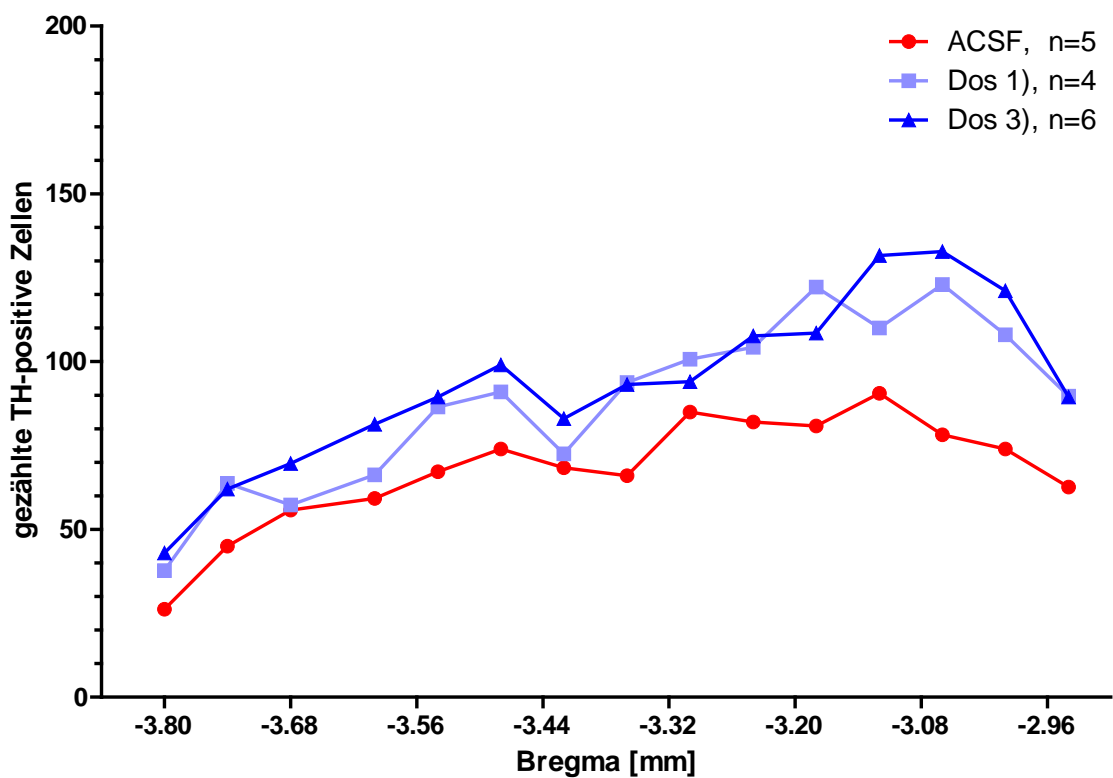


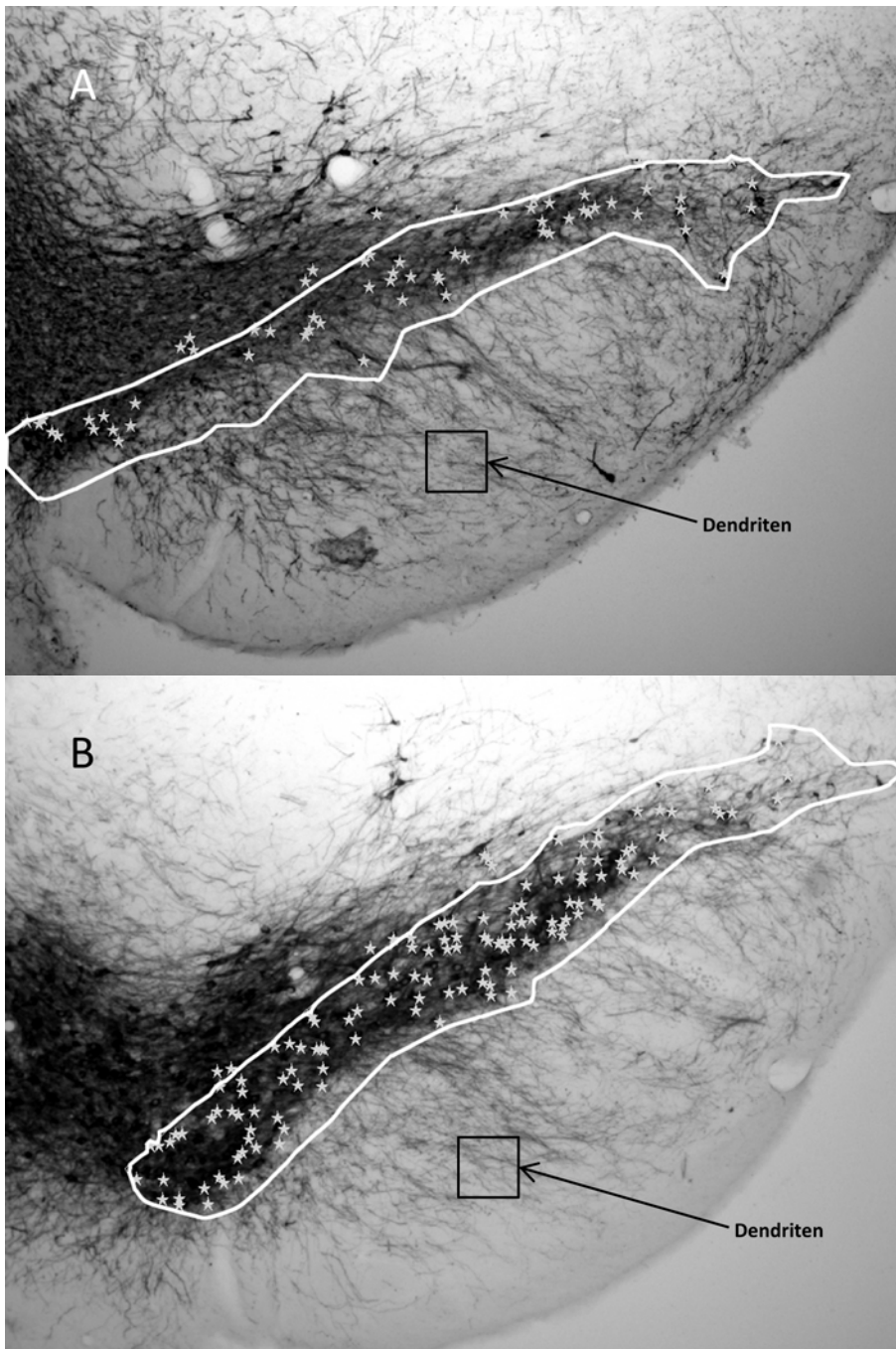
Abb. 22 Verläufe der Mittelwerte der gezählten TH-positiven SN- Zellen (counted cells) pro Hirnschnitt (Section) entlang der caudo-rostralen Achse

Dargestellt sind die Verläufe der Mittelwerte und der Standardfehler(SEM) der gezählten TH-positiven SN-Zellen der ACSF-, Dos1)- und Dos3)-Gruppe. Von den 30  $\mu\text{m}$  dicken koronalen Mittelhirnschnitten, die zwischen Bregma -3,80 mm und -2,96 mm angelegt wurden, wurde jeder 2. analysiert. Daraus ergaben sich die hier dargestellten 15 Werte entlang der caudo-rostralen Achse.

In A sind die Mittelwerte und SEMs der ACSF- und der Dos1)-Gruppe aufgetragen. B zeigt die Mittelwerte und SEMs der ACSF- und Dos3)-Gruppe. In C sind die Mittelwerte der ACSF- und der Dos1)- und Dos3)-Gruppe gemeinsam aus Gründen der Übersichtlichkeit ohne die Standardfehler dargestellt.

Man erkannte eine signifikante Zellzahlerhöhung der beiden Dosis-Gruppen entlang der gesamten caudo-rostralen SN-Achse. Die Zellzahlerhöhung war in der Dos3)-Gruppe (+ ca. 38%) deutlicher ausgeprägt als in der Dosis 1)-Gruppe (+ ca. 31%) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Der rostrale SN-Bereich wies eine stärkere Zellzahlerhöhung auf als der caudale. Die durchschnittliche Zellzahlerhöhung auf den 4 rostralen Schnitten (Bregma -3,12 bis -2,94) betrug ca. 56% in der Dos3)-Gruppe und ca. 40% in der Dos1)-Gruppe im Vergleich zu dem rostralen Bereich der Kontroll-Gruppe (Bregma -3,12 bis -2,94).

Statistisch ausgewertet (Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung) ergaben sich globale Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (Ergebnis:  $p=0,0099$ ; \*\*signifikant) und zwischen den Bregma-Punkten (Ergebnis  $p<0,0001$ ; \*\*\*signifikant). Eine Wechselwirkung zwischen den Einflüssen der Gruppen und der Bregma-Punkte bestand nicht ( $p=0,93$ ; nicht signifikant).



**Abb. 23** Bilder koronarer TH-positiver Mittelhirn-Schnitte einer mit ACSF behandelten (Abb. A) und einer mit MPP<sup>+</sup>/Dos3 (Abb. B) behandelten C57Bl/6-Maus und gleichzeitige Darstellung der in dem Programm Stereoinvestigator angelegten region of interest und der Markierungen (Sterne) der gezählten Neurone

Die 30 µm dicken Schnitte wurden auf Höhe von Bregma -3,06 mm angefertigt.

Man erkennt die durchschnittlich maximale Zellzahlerhöhung mit 69% bei Bregma -3,06 mm der MPP<sup>+</sup>/Dos3-Gruppe (n=6) gegenüber der ACSF/Kontroll-Gruppe (n=4) (siehe Abb. 22). Auch die beobachtete geringere Dendriten-Dichte der MPP<sup>+</sup>/Dos3-Tiere ist zu erkennen.



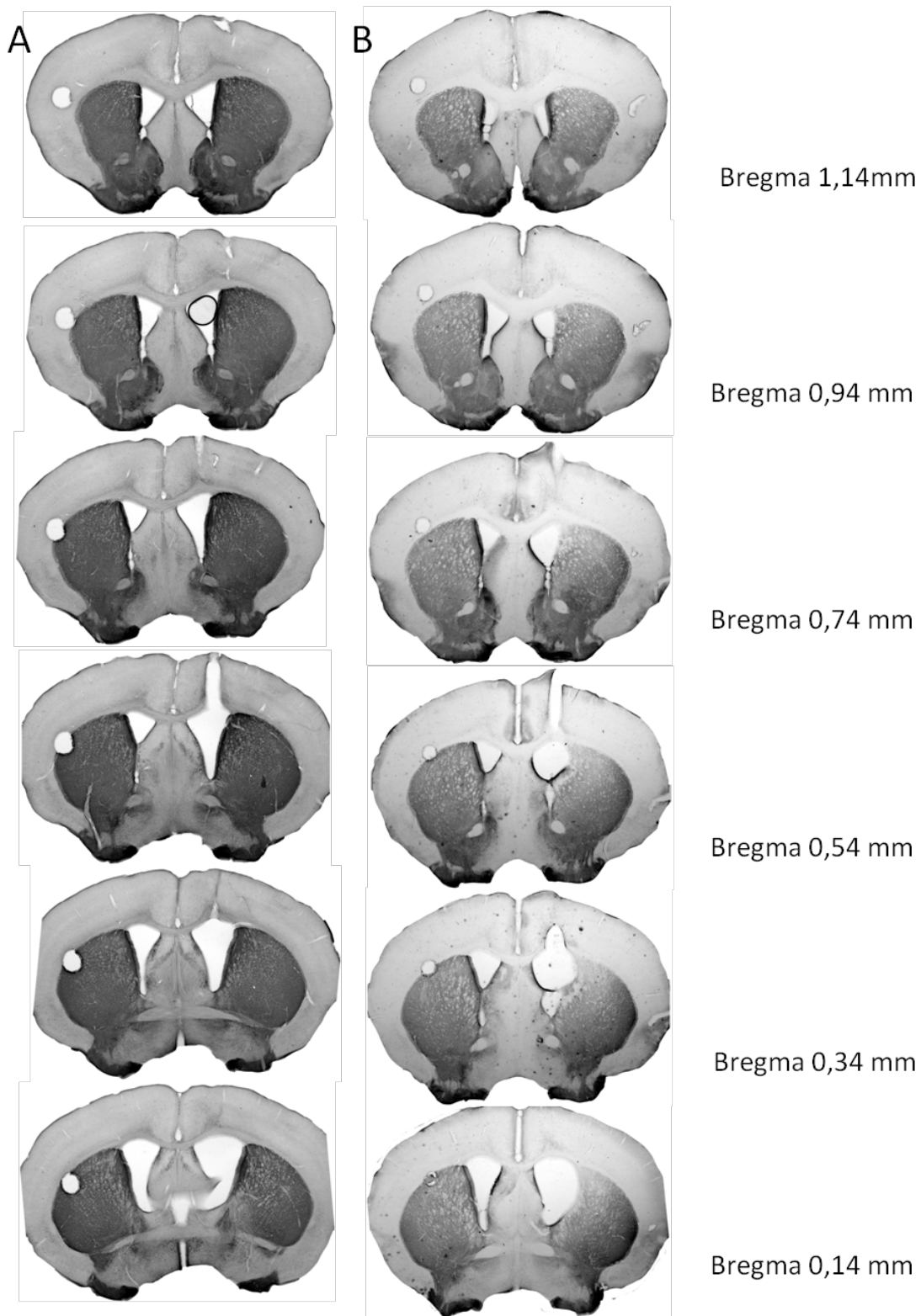
### 3.2 Dendritische Schädigung in der SN

Es konnte bei allen Dosis-Tieren eine unterschiedlich stark ausgeprägte dendritische Schädigung der TH-positiven SN-Zellen im Vergleich zur Kontrolltier-Gruppe festgestellt werden. Dies war deutlich an den ventralen, in die Substantia nigra pars reticulata (SNr) ragenden Dendriten der Substantia nigra pars compacta (SNc) zu erkennen. Dort stellten sich die Dendriten gut dar, da es kaum Überlagerungen mit TH-positiven Zellsomata gab. Die geringere Dichte der Dendriten in den Dosis-Gruppen fiel in diesem Bereich besonders auf, verglich man sie mit der Kontrolltier-Gruppe (Abb. 23).

### 3.3 Optische Dichte-Messungen der TH-Immunoreaktivität im Striatum

Auf den TH-gefärbten Telencephalon-Schnitten waren im Vergleich zur contra-lateralen Seite und zu den ACSF/Kontroll-Tieren im Bereich der Implantationsstelle der Applikationskanüle und caudal von ihr bei den Tieren, die MPP+ erhielten, reduzierte Grauwerte im dorso-lateralen ipsilateralen Striatum zu erkennen. Die Grenze zum Ventrikel stellte sich unscharf dar und der Ventrikel wölbte sich stärker nach dorsolateral als auf der contra-lateralen Seite oder bei den Kontroll-Tieren (Abb. 24 und 25).

Die Aufteilung des Striatums in die 4 Quadranten (Abb. 26) ventrales Striatum contra-lateral (VSc), ventrales Striatum ipsi-lateral (VSi), dorsales Striatum contra-lateral (DSc) und dorsales Striatum ipsi-lateral (DSi) ermöglichte Rückschlüsse auf die Verteilung des in den Ventrikel infundierten Toxins, sofern eine Schädigung des Striatums (Reduzierung der optischen Dichte) vorlag.



**Abb. 24** Darstellung 6 serieller TH/DAB-gefärbter Telenzephalon-Schnitte im Bereich der Implantation der Applikationskanüle eines Tieres der ACSF/Kontroll-Gruppe (A) und eines der MPP<sup>+</sup>/Dos3-Gruppe (B)

Der Verlauf war von rostral nach caudal in 0,2 mm-Schritten zwischen 1,14 Bregma mm und 0,14 mm.

Man erkannte Aufhellungen im dorsalen TH-positiven Striatum auf der ipsi-lateralen Seite des MPP<sup>+</sup>/Dos3-Tieres. Ipsi-lateral verlief die Grenze zum Ventrikel unschärfer und der Ventrikel war zum Striatum hin erweitert, verglichen mit der contra-lateralen Seite und dem ACSF/Kontroll-Tier.

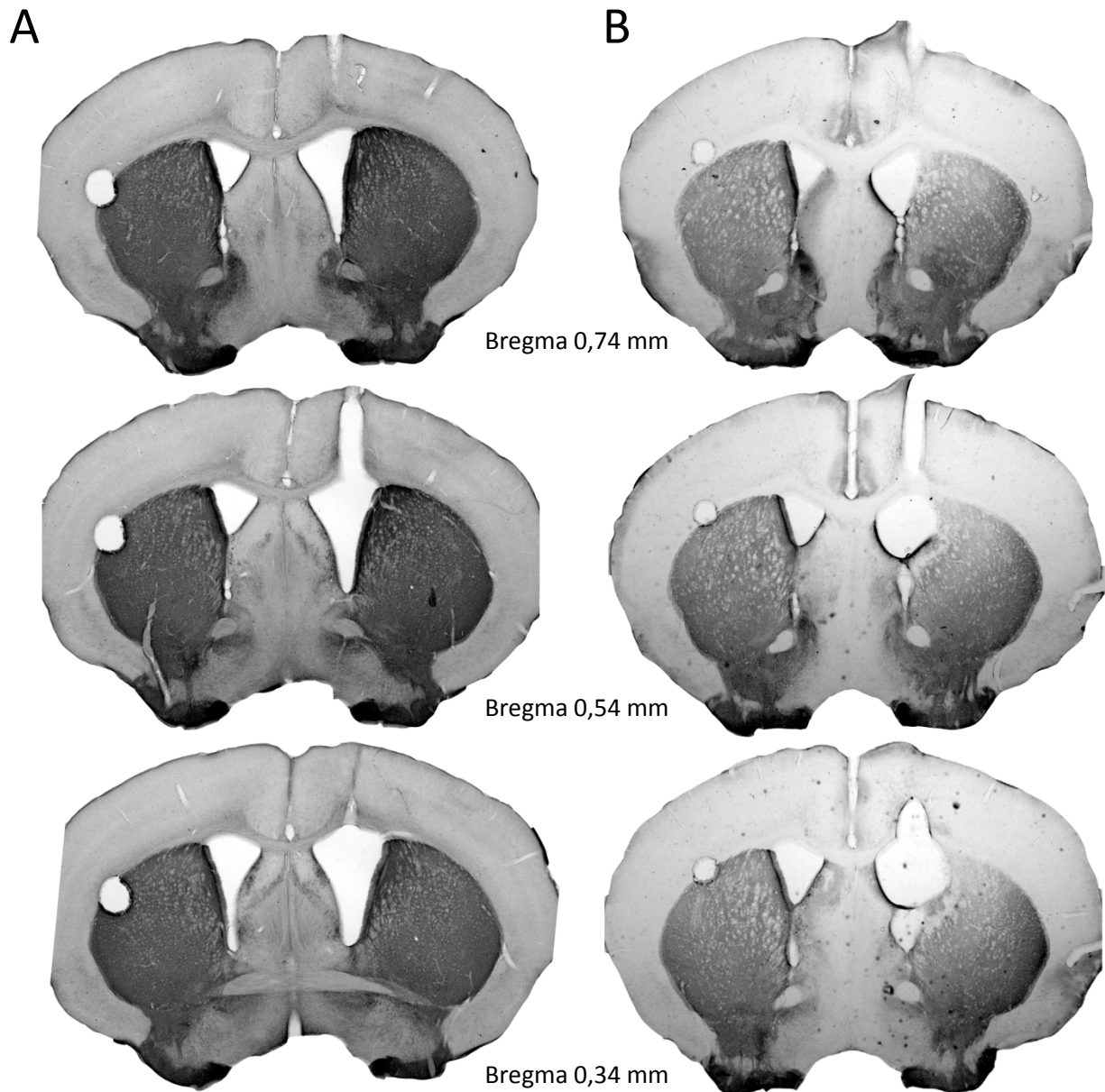
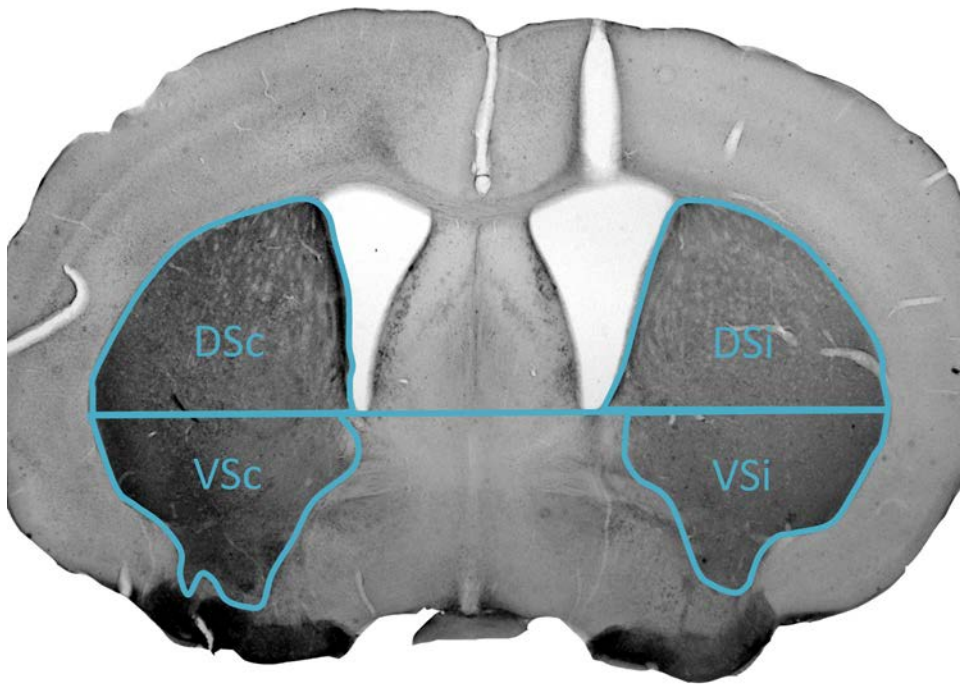


Abb. 25 (Ausschnitt aus Abb.24) Darstellung drei serieller TH/DAB-gefärbter Telenzephalon-Schnitte im Bereich der Implantation der Applikationskanüle eines Tieres der ACSF/Kontroll-Gruppe (A) und eines der MPP<sup>+</sup>/Dos3-Gruppe (B)

Der Verlauf war von rostral nach caudal in 0,2 mm-Schritten zwischen 0,74 Bregma mm und 0,34 mm.



**Abb. 26 Graustufen-Bild eines koronaren 100 µm dicken und TH/DAB-gefärbten Telenzephalon-Schnittes**

**Darstellung der 4 Striatum-Quadranten: dorsales Striatum contra-lateral (DSc), dorsales Striatum ipsi-lateral (DSi), ventrales Striatum contra-lateral (VSc) und ventrales Striatum ipsi-lateral (VSi)**

Die Messungen der Grauwert-Verteilung der ACSF/Kontroll-Gruppe und den 3 MPP<sup>+</sup>-Dosis-Gruppen in den 4 Striatum-Quadranten ergaben eine Reduzierung der mittleren Grauwerte mit steigender Dosierung (Abb. 27). Dies war im DSi am stärksten ausgeprägt (Abb. 27 B). Die maximale Reduzierung der optischen Dichte im DSi zwischen ACSF/Kontroll-Gruppe und der MPP<sup>+</sup>/Dos3)-Gruppe betrug 35%. Zu den beiden schwächeren Dosierungen betrug der Unterschied ungefähr 22%. Im DSc fand in der Dos2)- und Dos3)-Gruppe eine ähnlich starke Reduktion um ca. 22% statt (Abb. 27 A). Die Dos1)-Gruppe war nicht signifikant erniedrigt im Vergleich zur ACSF-Gruppe, genau wie im VSc und VSi (Abb. 27 C, D). Allerdings waren alle Dos1)-Mittelwerte niedriger als die ACSF-Mittelwerte. Im VSc betrug die maximale Reduktion der optischen Dichte der Dos3)-Gruppe 19% (Abb. 27 C) und im VSi 11% (Abb. 27 D). In beiden VS-Quadranten war der Abfall der Reduktion treppenförmig nach unten mit steigender Dosis. Die beiden ACSF-Kontrollgruppen-Mittelwerte im dorsalem Striatum ( DSi: 56,79; DSc: 55,47) wie auch im ventralen Striatum (VSi: 62,89; DSc: 63,04) lagen dicht beieinander.

## Statistische Auswertung der Optischen Dichte-Messungen: Dreifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen in den Faktoren *Quadrant* und *Bregma*

### 1) Haupteffekte:

Die drei Haupteffekte dieser Auswertung waren *Dosis*, *Quadrant* und *Bregma*. Bei den Signifikanzprüfungen der Haupteffekte wird getestet, ob sich die Stufen der Effekte statistisch signifikant unterscheiden, wobei über die Stufen der anderen Variablen der Mittelwert gebildet wird. Geprüfte Null-Hypothese  $H_0$ : Alle Mittelwerte sind gleich. Im Falle einer statistischen Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) wird  $H_0$  abgelehnt, d.h. mindestens ein Mittelwert weicht von den anderen Mittelwerten ab.

Ergebnisse Haupteffekte:

*Dosis*  $p=0,49$ ; nicht signifikant

*Quadrant*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*signifikant

*Bregma*  $p=0,0029$ ; \*\*signifikant

Die Stufen der Quadranten waren stark signifikant ( $p < 0,0001$ ) verschieden zu den Mittelwerten der anderen Variablen. Die Bregma-Punkte unterschieden sich ebenfalls signifikant ( $p=0,0029$ ). Aufgrund zu hoher Varianz der Daten konnte keine Signifikanz für den Haupteffekt *Dosis* erzielt werden.

### 2) Wechselwirkungen:

Es wird geprüft, ob die Unterschiede zwischen den Stufen des einen Faktors von den Stufen des anderen Faktors abhängig sind (Beispiel: QB=Wechselwirkung *Quadrant* x *Bregma*). Sind die Unterschiede zwischen den Bregma-Punkten Quadranten-abhängig? Oder sind die Unterschiede zwischen den Quadranten Bregma-abhängig?

Ergebnisse Wechselwirkungen:

*Quadrant* x *Dosis*  $p=0,13$ ; nicht signifikant

*Bregma* x *Dosis*  $p=0,85$ ; nicht signifikant

*Quadrant* x *Bregma*  $p=0,026$ ; \*signifikant

*Quadrant x Bregma x Dosis*  $p=0,98$ ; nicht signifikant

Für die Wechselwirkung zwischen *Bregma* und *Quadrant* konnte eine Signifikanz festgestellt werden ( $p=0,026$ ), so dass man annehmen kann, dass diese beiden Effekte voneinander abhängen.

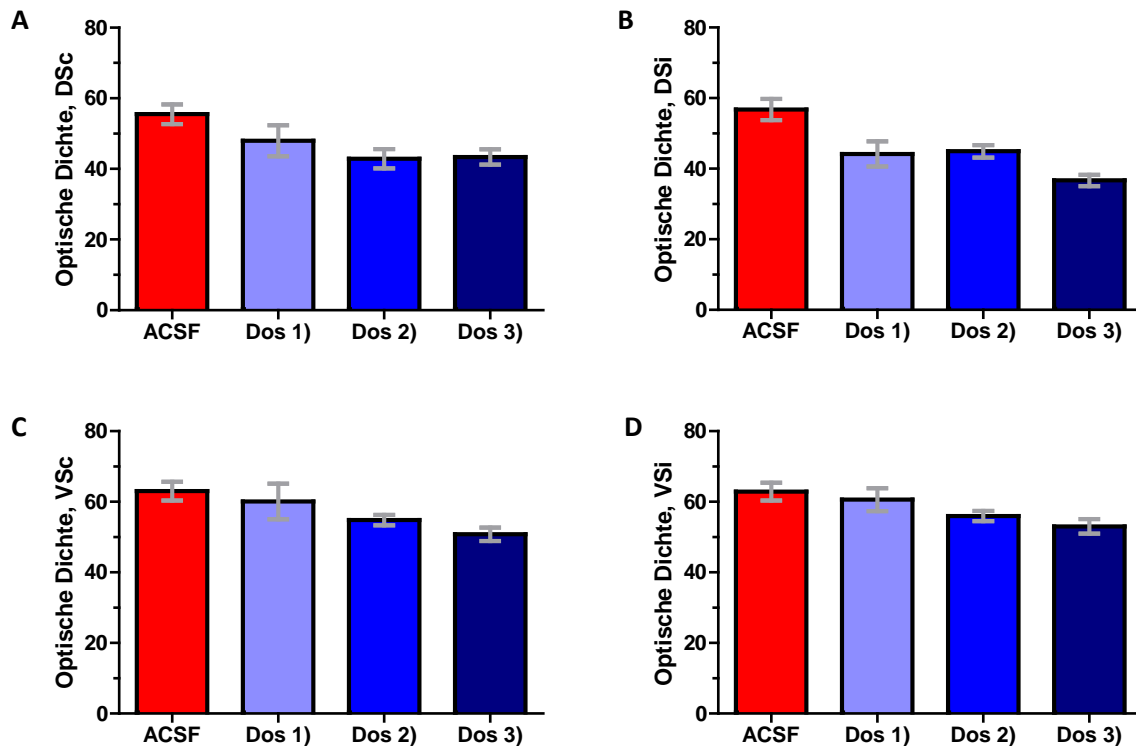


Abb. 27 MW und SEMs der optischen Dichte der ACSF/Kontroll- und der 3 MPP<sup>+</sup>/Dosis-Gruppen in den Quadranten DSc (A), DSi (B), VSc (C) und VSi (D)

Die 6 Messungen des Grauwerts pro Quadrant und Tier wurden gruppenweise (ACSF  $n=4$ , Dos1  $n=3$ , Dos2  $n=3$ , Dos3  $n=6$ ) über eine Mittelwertbestimmung zusammengefasst und für jeden Quadranten mit den zugehörigen SEMs angegeben (A bis D).

In allen Quadranten war eine Dosis-abhängige Reduktion der optischen Dichte zu erkennen, d.h. mit steigender Dosis nahm die optische Dichte ab. Die beiden VS-Quadranten wiesen einen treppenartigen Abfall der optischen Dichte mit steigender Dosis auf.

Im DSi der Dos3)-Gruppe fand der größte Optische-Dichte Verlust statt (Abb. B). Der MW der Dos3)-Gruppe lag im DSi ca. 35% unter dem MW der ACSF-/Kontroll-Gruppe. Die Werte der Dos1)- und Dos2)-Gruppen lag ca. 22% unter dem ACSF-Wert.

Im DSc (Abb. A) waren die maximalen Reduktions-Werte für die optische Dichte ca. 22% in der Dos2)-Gruppe und der Dos3)- Gruppe. Die Dos1)-Gruppe zeigte eine Tendenz zur Reduktion.

Auch im VSc (Abb. C) und im VSi (Abb. D) waren die Dos1)-Werte der optischen Dichte kaum erniedrigt im Vergleich zu den ACSF-Werten.

Im VSc war die maximale Reduktion zwischen ACSF- und Dos3)-Gruppe 19% und im VSi 11%.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer Dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen in den Faktoren Quadrant und Bregma. Sie ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Quadranten ( $p < 0,0001$ ; \*\*\*signifikant) und zwischen den Bregma-Punkten ( $p = 0,0029$ ; \*\*signifikant). Die Dosierungen unterschieden sich nicht signifikant ( $p = 0,49$ ) aufgrund von zu hoher Varianz der Daten. Eine Wechselwirkung bestand zwischen den Faktoren Quadrant und Bregma ( $P = 0,026$ ; \*signifikant).

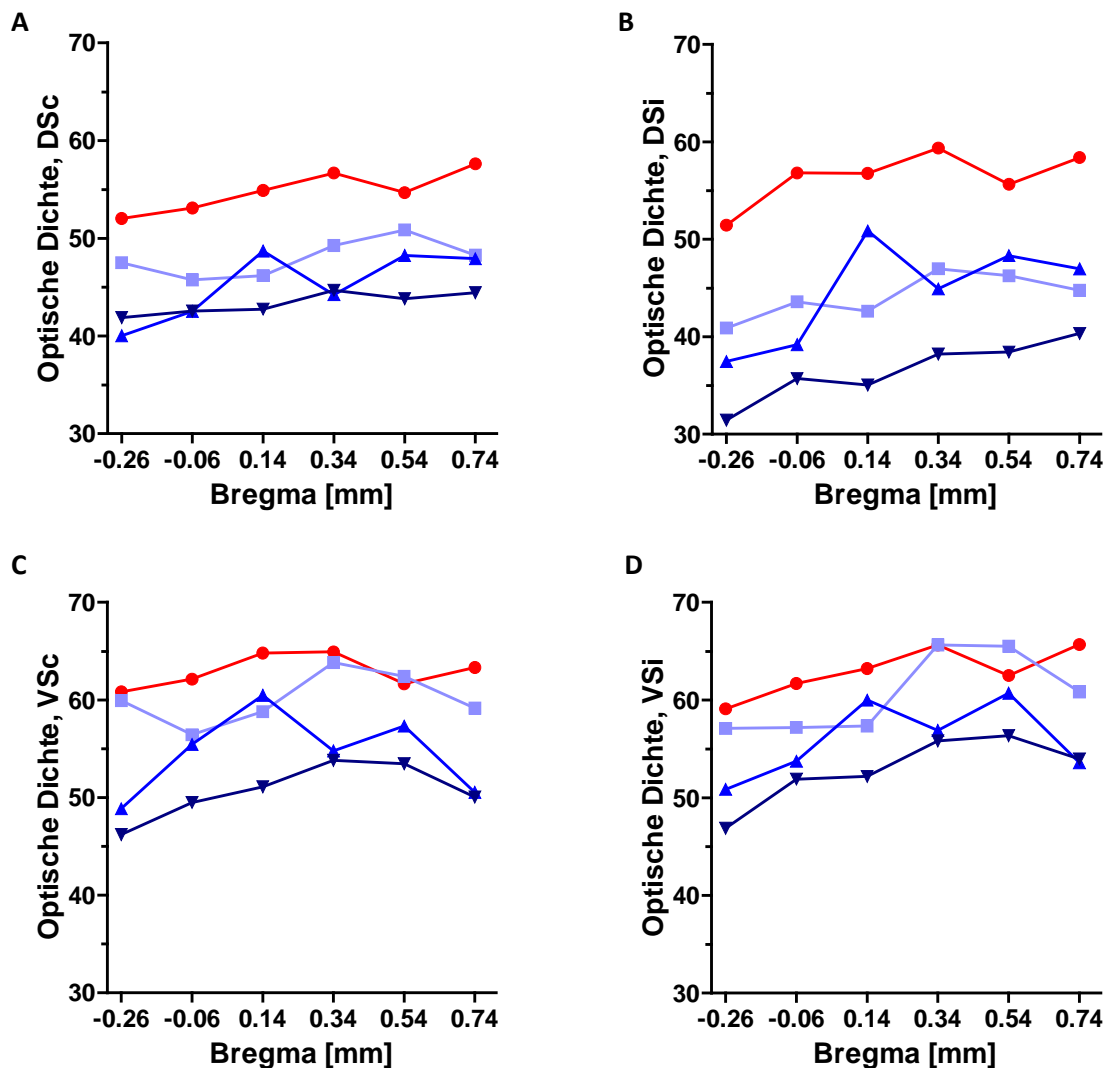


Abb. 28 Darstellung der 6 gemessenen optischen Dichte-Werte entlang der caudo-rostralen Achse eingeteilt in die Kontroll- und Dosis-Gruppen (ACSF  $n = 4$ , Dos1)  $n = 3$ , Dos2)  $n = 3$ , Dos3)  $n = 6$ )

Die Farbkodierung der ACSF/Kontroll-Gruppe und der MPP<sup>+</sup>/Dosis-Gruppen entspricht Abb. 27.

Man erkannte eine Reduktion der optischen Dichte bei den Dosis-Gruppen in allen 4 Striatum-Quadranten. Je höher die MPP<sup>+</sup>-Dosis war, desto stärker war die optische Dichte reduziert. Dies zeigte sich am deutlichsten im DSi (Abb B). Die Kurvenverläufe der Gruppen im DS und im VS ähnelten sich, verglich man die contra- und ipsi-laterale Seite. Im DSi waren die Werte der 3 Dosis-Gruppen durchschnittlich niedriger als im DSc. Die Reduktion der optischen Dichte im DSi war mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht traumatisch durch die MPP<sup>+</sup>-Applikationkanüle verursacht, da die ACSF-Gruppe im DSi keiner Reduktion der optischen Dichte unterlag.

Statistische Auswertung wie in Abb. 27.

## 4 Diskussion

Ziel der Studie war es, ein verbessertes chronisch-neurotoxikologisches Mausmodell zu etablieren. Unter Verwendung einer osmotischen Pumpe sollten kontinuierlich niedrige Mengen des aktiven Metaboliten 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium-Ion (MPP<sup>+</sup>) in den lateralen Ventrikel der Versuchstiere appliziert werden. Wiederholte Injektionen und die damit verbundenen Komplikationen (erhöhte Nebenwirkungen und Mortalität bedingt durch intermittierend hohe Toxin-Dosen und vermehrter Stress für die Tiere) würden dadurch entfallen. Gleichzeitig sollte dieses verbesserte Mausmodell möglichst viele pathologische und klinische Merkmale des Morbus Parkinson abbilden. Die Erwartung an den Ausgang des Versuchs war, eine chronische Degeneration dopaminerger Zellen zu initiieren, um diesen Aspekt der Parkinson Erkrankung beim Menschen möglichst ähnlich nachzubilden. Dies würde die Erprobung neuer Therapieansätze im Tiermodell deutlich verbessern.

### 4.1 Zusammenfassung der Befunde

#### 4.1.1 Zellzahlerhöhung TH-positiver SN-Zellen

Das erwartete Ziel durch die chronische MPP<sup>+</sup>-Applikation eine dem Morbus Parkinson ähnliche Neurodegeneration mit dem Verlust Tyrosinhydroxylase(TH)-positiver Substantia nigra (SN)-Neurone zu initiieren wurde nicht erreicht. In der vorliegenden Arbeit konnten signifikante globale Unterschiede zwischen den Gruppen ACSF, Dos1) und Dos3) festgestellt werden (Mittelwertvergleich mit Hilfe der Einfaktoriellen Varianzanalyse; Ergebnis  $p=0,0363$ ; \* signifikant). Im paarweisen Vergleich konnte überraschenderweise entgegen unserer Erwartungen eine signifikante Erhöhung TH-positiver SN-Zellen in der MPP<sup>+</sup>-Gruppe mit der höchsten Dosierung (Dos3)) um etwa 23% im Vergleich zur ACSF/Kontroll-Gruppe gezeigt werden (Tukey-Folgetest Ergebnis  $P<0,05$ ; \*signifikant). Zusätzlich war eine Tendenz zur Zellzahlerhöhung in der MPP<sup>+</sup>-Gruppe mit der niedrigsten Dosierung (Dos 1)) um etwa 12% verglichen mit der ACSF-Gruppe zu erkennen.



Bei Betrachtung der Zellzahlen pro Hirnschnitt über den caudo-rostralen Bereich der SN (Bregma -3,80 mm bis Bregma -2,96 mm) konnte eine Zellzahlerhöhung der Dos1)- und Dos3)-Gruppe im Vergleich zur ACSF/Kontrollgruppe festgestellt werden, die besonders deutlich im rostralen Drittel ausgeprägt war. Es bestanden globale Unterschiede zwischen den 3 Behandlungen ACSF, Dos1) und Dos3) (Ergebnis Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors Bregma:  $P=0,0099$ ; \*\*signifikant). Ebenfalls globale Unterschiede bestanden zwischen den Bregma-Punkten (Ergebnis  $P<0,0001$ ; \*\*\*signifikant). Es bestand keine Wechselwirkung zwischen den Einflüssen von Dosis und Bregma.

#### **4.1.2 Dendritischer Schädigung in der SN**

Die Dendriten der TH-positiven SN-Neuronen waren in der SN bei allen mit MPP<sup>+</sup> behandelten Tieren geschädigt, d.h. der dendritische Baum war bei vielen dopaminergen SN-Neuronen deutlich reduziert. Dies war besonders klar bei den in die Substantia nigra pars reticulata (SNr) hineinragenden dopaminergen Dendriten sichtbar, weil der Bereich keine TH-positiven Zellkörper aufwies, die Überlagerungen verursachten. Im Vergleich zur Kontrolltier-Gruppe erkannte man eine unterschiedlich stark ausgeprägte Reduktion der Dendriten-Dichte in den mit MPP<sup>+</sup> behandelten Gruppen verglichen mit der Kontrolltier-Gruppe.

#### **4.1.3 Reduktion der optischen Dichte der TH-Immunoreaktivität im Striatum**

Bei der Analyse der axonalen TH-Immunoreaktivität im Striatum wurden zwei Befunde deutlich. Zum einen gab es eine klare TH-Reduktion in unmittelbarer Nähe zur Applikationskanüle, zum anderen eine globale Reduktion der Immunoreaktivität im ipsilateralen dorso-lateralen Striatum. Während bei der lokalen Reduktion eine mechanische Schädigung nicht ausgeschlossen werden kann, ist die globale Reduktion der TH-Immunoreaktivität höchst wahrscheinlich durch die chronische Infusion von MPP<sup>+</sup> verursacht. Die Messungen der Grauwertverteilung in den 4 Striatum-Quadranten, nahe der Implantation der Applikationskanüle ergaben eine Reduktion der mittleren Grauwerte mit steigender Dosis. Die maximale Reduktion von ca. 35% bestand im dorso-lateralen

Quadranten ipsilateral (DSi) und legt eine axonale Schädigung der dopaminergen SN-Neuronen nahe.

Zudem war auf den Telencephalon-Schnitten im Vergleich zur contra-lateralen Seite und zu den ACSF/Kontroll-Tieren im Bereich der Implantationsstelle der Applikationskanüle und caudal von ihr bei den Dosis-Tieren verringerte Grauwerte im dorso-lateralen Striatum zu erkennen.

Statistisch ausgewertet konnte ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Quadranten ( $p < 0,0001$ ; \*\*\*signifikant) und den Bregma-Punkten ( $p = 0,0029$ ; \*\*signifikant) festgestellt werden (Dreifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen in den Faktoren Quadrant und Bregma). Die Stufen für die Dosis unterschieden sich im Vergleich zu den anderen Variablen nicht signifikant ( $p = 0,49$ ), was durch eine zu hohe Varianz der Daten zu erklären ist. Bei der Prüfung auf Wechselwirkungen konnte festgestellt werden, dass die Faktoren Bregma und Quadrant voneinander abhängen (Wechselwirkung Quadrant x Bregma  $p = 0,026$ ; \*signifikant).

#### **4.1.4 Reduzierte Mortalität und Belastung der Versuchstiere**

In fast allen Fällen verliefen operative Eingriffe (Im- und Explantation der osmotischen Pumpen) und peri- und postoperative Betreuung komplikationslos. Dies ist eine deutliche Verbesserung verglichen mit den mit hoher Mortalität verbundenen MPTP-Tiermodellen, die das Toxin systemisch via Injektion applizieren. Die Beeinträchtigungen durch die Operationen und das Tragen der Pumpe waren gering. Die Mortalität in dieser Versuchsserie lag bei etwa 15% (siehe 2.2.4).

Das Stress-Niveau der Tiere war über die gesamte Dauer des Versuchs verglichen mit Toxin-Modellen, die häufiger Injektionen bedürfen, niedrig. Die Gruppen-Haltung von zwei Tieren pro Käfig und das Anreichern der Käfige mit Versteckmöglichkeiten und Nestmaterial ermöglichte den Mäusen zusätzlich eine artgerechtere Lebensweise.

## 4.2. Neurodegeneration oder adulte Neurogenese?

Die zentrale Erwartung an den Ausgang des Versuchs war es, einen chronisch degenerativen Prozess in Gang zu bringen, bei dem es zu einem Zellzahl-Verlust TH-positiver SNc-Zellen kommen würde (Yazdani et al. 2006). Überraschenderweise wurde diese Erwartung nicht erfüllt. Im Gegenteil, es fand sich eine signifikante Erhöhung der TH-positiven Neuronen in der SN bei gleichzeitiger axonaler Schädigung im Striatum. Im Folgenden werden zwei biologische Mechanismen diskutiert, die diese Befundkonstellation erklären könnten: (1) MPP<sup>+</sup>-stimulierte adulte Neurogenese in der SN und (2) MPP<sup>+</sup>-stimulierte Transdifferenzierung zu TH-positiven Neuronen.

### 4.2.1 Adulte Neurogenese

Neurogenese (NG) im adulten Säugetiergehirn ist noch nicht lange bekannt. Vorstöße von Altmann und Kollege in den 60er Jahren (Altman 1963, Altman & Das 1965, Altman 1969) und Kaplan und Kollegen um 1980 (Kaplan & Hinds 1977, Kaplan 1981, Kaplan & Bell 1984) gab es zwar, fanden aber nicht viel Beachtung. Altmann und Kaplan nutzten radioaktive <sup>3</sup>H-Thymidin-Markierungen und Lichtmikroskopie und entdeckten neugeborene Zellen mit Neuronen-ähnlicher Zellmorphologie im Bulbus olfaktorius (BO), Hippocampus (Hc) und Neokortex adulter Ratten. Die Methode Altmanns, Tieren das radioaktiv markierte Nukleotid Thymidin zu injizieren, das in die DNA mitotischer Zellen eingebaut wird, wurde bis Ende der 1990er Jahre in Verbindung mit Autoradiographie hauptsächlich verwendet, um neugeborene Neurone aufzuspüren. Um falsch positive Funde durch Zellüberlagerungen mit nicht-neuronalen Zellen zu verhindern, untersuchte man die Schnitte nach Einführung der Elektronenmikroskopie zusätzlich mit dieser Methode (Kaplan & Hinds 1977, Kaplan 1981, Kaplan & Bell 1984). Auf diese Weise wurden von Kaplan mit <sup>3</sup>H-Thymidin markierte Zellen im Bulbus olfaktorius, Gyrus dentatus des Hippocampus und im visuellen Kortex adulter Nager auch morphologisch als Neurone identifiziert.

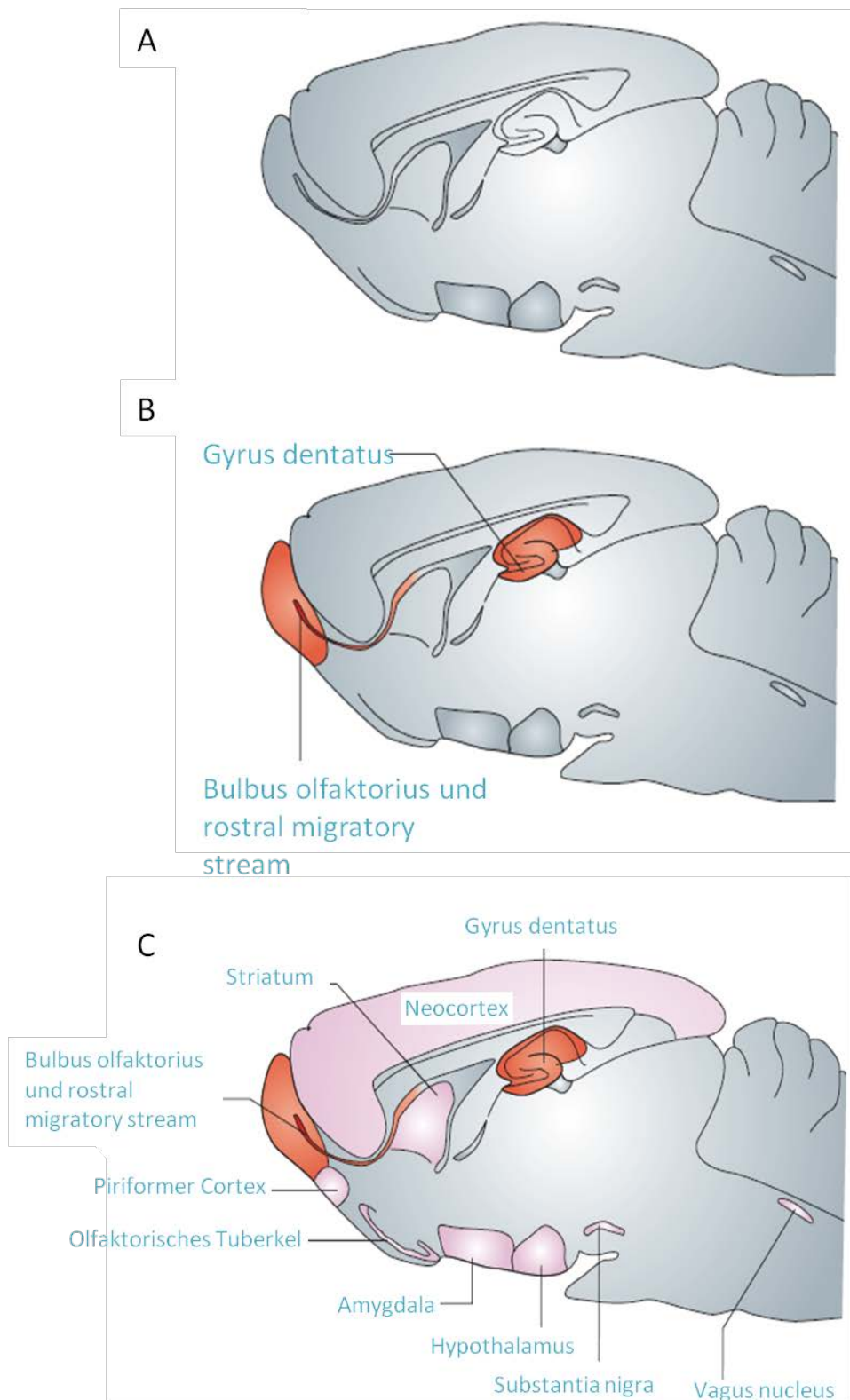
In den 1980iger Jahren wurden Studien veröffentlicht, die überzeugend Neurogenese im Gesangs-Zentrum von adulten Vögeln belegten. Es wurde nachgewiesen, dass neue Zellen am Rand des Ventrikels geboren werden, die an ihren Bestimmungsort wandern, wo sie

Eigenschaften von Neuronen annehmen (Goldmann & Nottebohm 1983, Alvarez-Buylla & Nottebohm 1988, Alvarez-Buylla und Kollegen 1988). In den folgenden Jahren wurde wieder vermehrt adulte Neurogenese im Hippocampus adulter Nager und adulter Primaten erforscht. Die Forschungsergebnisse dieser Arbeiten lieferten bereits eindeutige Hinweise daraufhin, dass adulte Neurogenese im Säugetiergehirn stattfindet (Gould 2007). Aufsehen erregten 1998 Eriksson und Kollegen mit einer Studie, die Neurogenese im menschlichen Gehirn bestätigte. Sie untersuchten Gehirne von 5 an Krebs verstorbenen Patienten, die kurz vor ihrem Tod zu diagnostischen Zwecken den Marker für proliferierende Zellen Bromodeoxyuridine (BrdU) erhalten hatten (Eriksson et al. 1998). Das systemisch applizierte Nukleotid, das wie  $^3\text{H}$ -Thymidin in die DNA sich teilender Zellen eingebaut wird und mittels Antikörper detektiert werden kann, markierte nicht nur die mitotischen Zellen der Tumore, sondern auch Zellen im Hippocampus, vor allem in der Subgranulären Zone (SGZ) und Granulären Zellschicht (granule cell layer). Durch Co-Markierungen von neuronalen Proteinen (neural nuclei antigen, NeuN) konnten Eriksson und Kollegen adulte NG im Hippocampus endgültig belegen.

Seit Mitte der 1990er Jahre gilt die BrdU-Markierung in Verbindung mit dem Nachweis neuronaler Proteine (vor allem NeuN) und Identifikation in 3 Ebenen im Konfokalen Mikroskop als die aussagekräftigste Methode, um adulte Neurogenese nachzuweisen (Gould 2007, Arias-Carrion, Zhao 2003 und 2009).

Zwei Studien (Lois & Alvarez-Buylla 1994, Corotto et al. 1994) beschrieben adulte NG im Bulbus olfaktorius von Nagern, ließen allerdings die Frage offen, ob adulte NG im Bulbus olfaktorius auch im menschlichen Gehirn stattfindet. 2004 veröffentlichten Bedard und Parent Daten, wonach beim Menschen in ähnlicher Weise wie bereits beim Nager beschrieben Neurone als Neuroblasten in der Subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels geboren werden und über den Rostral Migratory Stream (RMS) in den Bulbus olfaktorius einwandern und sich dort zu Interneuronen ausdifferenzieren (Bedard & Parent 2004). Curtis und Kollegen fassten die bisherigen Analysen der pathologischen Vorgänge an der Subventrikulären Zone (SVZ) bei den neurodegenerativen Krankheiten Morbus Huntington, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson (Curtis et al. 2007) zusammen. Die Übersichtsarbeit belegte und beschrieb den RMS, die adulte NG der SVZ und gab einen Ausblick auf die therapeutischen Möglichkeiten dieser Erkenntnisse. Die bei Morbus

Parkinson von der SN ausgehenden Denervation des Striatums führt zu mangelnder Erregung der D1-, D2- und D3-Rezeptoren im Striatum. Dies verursacht über die Verschaltungen des Basalgangliensystems eine Hypoexzitation des Motorkortex, was die Verlangsamung der motorischen Abläufe auslöst. Die in der SVZ normalerweise stattfindende Vorläuferzell-Proliferation mit entstehenden Neuroblasten, die entlang des RMS in den Bulbus olfaktorius einwandern, um dort zu Neuronen zu differenzieren, ist im Tiermodell und bei PD-Patienten verringert. Die reduzierte Neurogenese im Bulbus olfaktorius löst bei den Versuchstieren eine Beeinträchtigung des Geruchssinns aus. Bei menschlichen PD-Patienten ist dies auch ein frühes Symptom der Erkrankung.



**Abb. 29** Änderung in der Betrachtung von adulter NG in den letzten 15 Jahren, schematisch anhand eines Rattengehirns

**A:** vor 1990 wurde das gesamte adulte Gehirn als nicht-neurogen angesehen (grau)

**B: In den späten 1990ern wurden nur die Subventrikuläre Zone, der rostral migratory stream und der Bulbus Olfactorius sowie die Subgranuläre Zone im hippocampalen Gyrus dentatus als neurogen angesehen (rot).**

**C: Gegenwärtig sind zu den zwei bereits bekannten neurogenen Zonen (rot) weitere hinzugekommen für die adulte NG vermutete wird (rosa).**

**(Quelle: Gould 2007, modifiziert)**

Nachdem Ende der 1990er Jahre adulte Neurogenese in der Subgranulären Zone (SGZ) des hippocampalen Gyrus dentatus und in der Subventrikulären Zone (SVZ) des lateralen Ventrikels als gesichert galt, begann man von neurogenen und nicht-neurogenen Bereichen des Gehirns zu sprechen. Es mehrten sich die Studien, die Neurogenese auch in bisher nicht-neurogenen Hirnarealen (Neocortex, Striatum, Amygdala, Hypothalamus, Substantia Nigra, olfaktorischer Tuberkel, piriformer Cortex, Hirnstamm) bestätigt sahen (Gould 2007, siehe Abb. 29). Hier sind besonders hervorzuheben die Arbeiten von Zhao und Kollegen (Zhao et al. 2003) und Zhao und Lang (Zhao M & Lang 2009), die in diesen beiden Studien Belege für eine milde adulte Neurogenese in der MPTP-geschädigten SNc (2003) und der ungeschädigten SNc (2009) lieferten. Zhao und Kollegen konnten nach 21 Tagen intraventrikulärer (icv) Infusion von BrdU in hoher Dosierung (150 mg/ml) etwa 20 BrdU-positive Neurone in der gesunden SN (ca. 12 000 Neurone) identifizieren. Im Vergleich dazu konnten im Hippocampus unter den gleichen Bedingungen etwa 10 000 BrdU-positive SGZ-Neurone entdeckt werden (Zhao et al. 2003). Dies zeigte wie außerordentlich niedrig die NG-Rate in der gesunden SN war und erklärte die Schwierigkeiten der Nachweisbarkeit in anderen Arbeiten. Die Arbeiten von Frielingsdorf und Kollegen und Mophael und Kollegen fanden keine BrdU-markierten TH-positiven Neurone in der Nager-SNc (Frielingsdorf et al. 2004, Mophael et al. 2005). Gould und Zhao & Lang erklärten die große Variabilität in den Forschungsergebnissen mit entscheidenden Unterschieden in der Methodik. Ihrer Ansicht nach müssten die Protokolle an die Tatsache angepasst werden, dass die NG-Rate in nicht-neurogenen Hirnarealen außerordentlich niedrig sei im Vergleich zur SVZ oder SGZ. Die Sensitivität mancher Protokolle sei nicht hoch genug gewesen, die mikroskopische Auswertung nicht standardisiert und die neugeborenen Neurone bräuchten drei Wochen zur Ausdifferenzierung zu mit BrdU-nachweisbaren NeuN-positiven Zellen.

Van Kampen & Robertson infundierten Ratten über 2 Wochen in den 3. Ventrikel via subkutaner osmotischer Pumpe den D<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten 7-OH-DPAT. Zusätzlich erhielten die Ratten in diesen zwei Wochen täglich BrdU-Injektionen. Der D<sub>3</sub>-Rezeptor stellt einen wichtigen Regulator der prä- und postnatalen Gehirnentwicklung dar (Van Kampen & Robertson 2005). An der SVZ bleibt D<sub>3</sub>-Rezeptor-Expression auch nach der Embryonalentwicklung bestehen. Die Infusion von 7-OH-DPAT in den 3. Ventrikel bewirkte einen signifikanten Anstieg BrdU-positiver Neurone entlang des 3. Ventrikels und in der SNc im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Der Charakter dieser BrdU-positiven Zellen war überwiegend neuronal (NeuN-positiv), in der SNc auch dopaminerg (TH-positiv). Ebenso stieg der Marker für proliferierende Zellen Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) nach 7-OH-DPAT-Infusion an. Im Unterschied zu BrdU kann man ihn nur zum Zeitpunkt der tatsächlichen Proliferation nachweisen (BrdU bleibt auch nach Proliferation in den Zellen nachweisbar). Die Arbeit von Van Kampen & Robertson unterstützte die starken Hinweise auf die Existenz eines neurogenetischen Potentials der adulten SN und zeigte eine Möglichkeit auf, Zellproliferation (vermutlich sogar Neurogenese dopaminerger Neurone) in der SNc zu stimulieren (Van Kampen & Robertson 2005).

In der Folgearbeit von Van Kampen und Eckman wurde der D<sub>3</sub>-Agonist in einem 6-Hydroxydopamin-Degenerationsmodell eingesetzt. Die Ergebnisse von 2005 konnten bestätigt werden. Die 7-OH-DPAT-Infusion bewirkte eine Proliferation von Zellen mit dopaminergen und neuronalem Charakter. Mittels retrogradem Tracing konnte auch eine striatale Innervation dieser Zellen belegt werden. Gleichzeitig verbesserte sich das lokomotorische Verhalten der Tiere (Van Kampen & Eckman 2006).

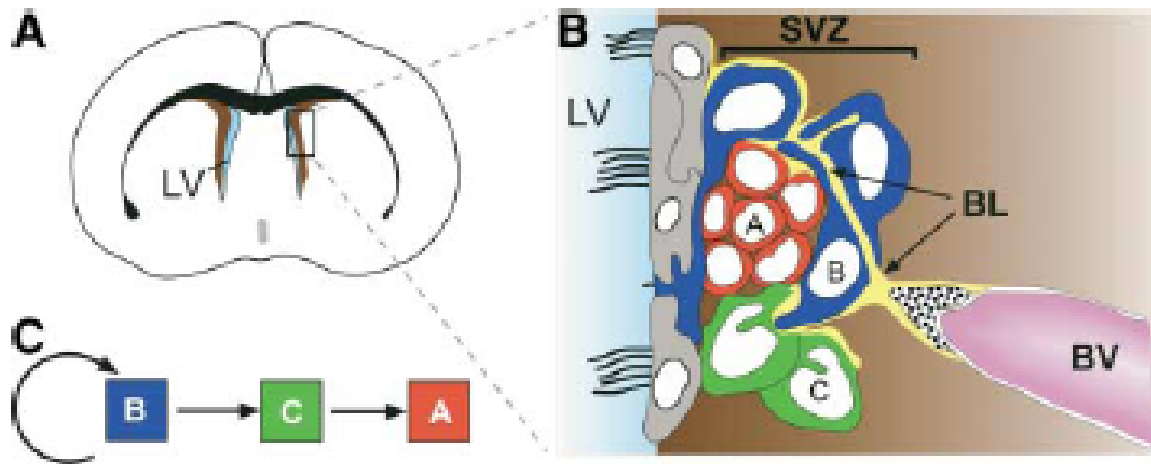
Auch Shan und Kollegen zeigten, dass in der normalen adulten Maus Neurogenese und teilweise auch dopaminerge Neurogenese in der SN mit hoher Wahrscheinlichkeit stattfindet. Sie verwendeten transgene pNes-LacZ-Mäuse, die es ermöglichten neuronale Stammzellen (NSC) im adulten Gehirn nachzuweisen, kombiniert mit einem MPTP-Parkinson-Modell. Zusätzlich erhielten die pNes-LacZ-Mäuse BrdU i.p. über 15 Tage (10 mg/ml). Es konnten NeuN-positive/LacZ-positive Zellen (NSCs) im normalen Gehirn identifiziert werden, was die adulte NG belegt. Die gleichzeitige Färbung dieser Zellen mit TH (dem dopaminergen Marker) fand beim nicht-läsionierten Gehirn nicht statt. Allerdings waren unter den BrdU-positiven auch TH-positive Zellen vertreten, was die Autoren annehmen ließ, es finde adulte



NG statt, die von unterschiedlichen Stammzelllinien ausgeht. Der Verlust von dopaminergen Neuronen durch MPTP-Injektionen verstärkte die allgemeine adulte NG und die dopaminerge NG in der SN signifikant (Shan et al. 2006).

Das Vorkommen und die Proliferation von NSCs wurde in verschiedenen nicht-neurogenen Hirnregionen (Cortex, Amygdala, dorsal vagal complex, area CA1 des Hc, Rückenmark, Striatum, weiße Substanz Trakte und SNc) belegt (Arias-Carrion et al. 2007, Magavi et al. 2000, Chen et al. 2004, Nakatomi et al. 2002, Arvidsson et al. 2002). Diese NSCs sind in vitro unter bestimmten Bedingungen zur Ausreifung zu funktionsfähigen Nervenzellen fähig (Arias-Carrion et al. 2007). Lie und Kollegen wiesen proliferierende Zellen in der SN mittels BrdU-Markierung und retroviraler GFP-Markierung nach (Markierung mit einem grün fluoreszierenden Protein, GFP, und gleichzeitige Verwendung von Retroviren als Vehikel). Mittels Gliazell-Markern konnte gezeigt werden, dass die proliferierenden NSCs in vivo zu Gliazellen ausreifen. Einige dieser NSCs wurden aus der SN entnommen und in vitro kultiviert. Diese Zellen waren unmittelbar nach Entnahme fähig zu Neuronen zu reifen. Die Transplantation einiger dieser SN-Zellen in den adulten Hippocampus zeigte, dass sie auch in vivo zu Neuronen differenzieren können. Im Gegensatz dazu reiften dieselben Zellen re-implantiert in die SN zu Glia-Zellen aus. Dies führte zu dem neuen Erkenntnis, dass es Signale im Umgebungsmilieu der SN-Zellen geben muss, die die Ausreifung von NSCs zu Neuronen verhindern. Könnte man dieses Neurogenese-hemmende Milieu in der SN beeinflussen, wären neue restaurative Zelltherapien bei PD denkbar.

Weitere Untersuchungen stellten ebenfalls große Unterschiede im Mikromilieu zwischen neurogenen und nicht-neurogenen Arealen fest. Die nicht-neurogenen Hirnareale wiesen eine stark NG-hemmende Umgebung auf (Kornack und Racik 2001, Lie et al. 2002, Bhardwaj et al. 2006, Höglinger et al, 2007). Alvarez-Buylla und Lim beschrieben genau dieses spezielle Mikromilieu in dem „Germinal Niche“, den Keimzellnischen des adulten Gehirns (Alvarez-Buylla & Lim 2004). Demnach haben sich die beiden Keimzellnischen SGZ und SVZ einen gewissen embryonalen Charakter mit embryonalen Morphogenen und Signalen bewahrt. Sie enthalten Astrozyten, die als Stammzellen und Nischenzellen dienen und dazwischen eine Basallamina, die in Verbindung mit nahegelegenen Blutgefäßen und Makrophagen steht. Die Autoren vermuten eine Interaktion zwischen Vaskulo- und Neurogenese (Abb. 30)



**Abb. 30** Adulte Neurogenese in der SVZ

**A:** Koronaler Schnitt eines adulten Mäusegehirns. Der Laterale Ventrikel (LV) ist hellblau gekennzeichnet und die SVZ braun. Der Ausschnitt ist Abb. B.

**B:** Aufbau der SVZ. Die B-Zellen (dunkelblau) sind die Astrozyten, die gleichzeitig als Nischenzellen fungieren. Manche dieser Zellen haben Kontakt zum Ventrikel-Lumen und besitzen eine einzige Zilie. Die C-Zellen (grün) sind sich rasch vermehrende Übergangszellen, die sich aus den B-Zellen entwickeln. Aus den C-Zellen werden A-Zellen (rot). Sie stellen die Neuroblasten dar, die zum olfaktorischen Tuberkel migrieren. Dort werden sie zu Interneuronen. Es ist ein Blutgefäß (BV) gezeigt mit einem perivaskulärem Makrophagen (gepunkteter Inhalt). Vom Blutgefäß geht eine Basallamina (BL, gelb) aus, die zwischen die SVZ-zellen ragt. Mit Zilien besetzte Ependymzellen (grau) kleiden den Ventrikelraum aus. Sie produzieren Noggin, eines der Signale, die diese Nische für die Zellentwicklung benötigt.

**C:** Abstammungslinie der SVZ-Zellen.

(Quelle: Alavarez-Buylla und Lim 2004)

Unser als chronisches Degenerationsmodell ausgelegtes Experiment könnte wie erwartet eine milde Reduktion der dopaminergen SNc-Zellen verursacht haben, die die Proliferation und Ausdifferenzierung von NSCs in der SN zu TH-positiven Nervenzellen stimuliert hat. Da die Tiere erst 4 Wochen nach Beendigung der MPP<sup>+</sup>-Gabe euthanasiert und perfundiert wurden, wäre dies zeitlich gesehen auch möglich gewesen. Zhao und Lang und Gould beschrieben den Zeitraum, den die NSCs zur Ausreifung zu Nervenzellen brauchen, die mittels BrdU detektiert werden können, mit 21 Tagen (Zhao & Lang 2009, Gould 2007). In

Tiermodellen, die eine neurodegenerative Erkrankung/Schädigung des Gehirns nachahmen (PD, Morbus Huntington, Morbus Alzheimer, Schlaganfall) werden NSCs vermehrt in Stammzellnischen gebildet und migrieren an den Ort der Schädigung (Curtis et al. 2007). Auch in unserem Modell wäre eine durch dopaminerge Zellschädigung angeregte NSC-Proliferation außerhalb der SN und anschließende Migration in die SN denkbar.

Interessanterweise gibt es Berichte über den Zusammenhang zwischen den Umständen der Haltung der Tiere und Neurogenese. Kempermann und Kollegen haben gezeigt, dass im Gyrus dentatus von Mäusen, die in einer „angereicherten Umgebung“ lebten, signifikant mehr Neurone geboren wurden (Kempermann et al. 1997). Eine mögliche Erklärung dafür wäre die räumliche Nähe der Stammzellnischen zu Blutgefäßen. Man vermutet, dass Hormone und Wachstumsfaktoren aus dem Blutkreislauf wie IGF-1 (insulin like growth factor) aus der Leber und VEGF (vascular endothelial growth factor) aus Endothelzellen NG positiv beeinflussen können. IGF-1 und VEGF werden durch Bewegung vermehrt sezerniert und könnten somit positiven Einfluss auf die Proliferation der Vorläuferzellen nehmen (Trejo et al. 2001, Fabel et al. 2003). Glucocorticoide aus der Nebennierenrinde, die durch Stress ausgeschüttet werden, hingegen würden die NG verringern (Bischofsberger & Schmidt-Hieber, 2006). Da die Mäuse in unserem Versuch ebenfalls in einer „angereicherten Umgebung“ lebten und die gesamte Durchführung des Versuchs Stress-Minimierung für die Tiere im Fokus hatte, wäre ein positiver hormoneller Einfluss auf die NG denkbar.

Zur Prüfung adulter Neurogenese in der SN in diesem Versuchsvorhaben wäre ein Folge-Versuch unter gleichen Bedingungen mit Tieren, die die höchste MPP<sup>+</sup>-Dosis (0,3 mg/kg/d) und gleichzeitig den Marker für neugeborene Zellen BrdU erhalten, sinnvoll. Ein Vergleich mit Kontroll-Tieren, die nur MPP<sup>+</sup> erhielten, und die gleichzeitige Färbung mit TH würden die neugeborenen Zellen als Dopamin-produzierende Nervenzellen charakterisieren.

Hinweise dafür, dass eine Toxin-bedingte axonale Schädigung bei den Dosis-Tieren stattfand, lieferten Befunde aus dem Striatum. Die mit steigender Dosis zunehmende Reduktion der optischen Dichte, die am stärksten auf den Schnitten nahe der MPP<sup>+</sup>-Applikationsstelle ausgeprägt war, deuteten auf eine durch MPP<sup>+</sup> hervorgerufene Schädigung hin.

#### 4.2.2 Transdifferenzierung zu TH-positiven Neuronen

Neben den klassischen dopaminergen Neuronen, die die Enzyme Tyrosinhydroxylase (TH) und Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) der Dopamin-Synthese und den DA-Transporter (DAT) aufweisen, sind auch Neurone bekannt, die einen nur teilweise dopaminergen Charakter haben. Die meisten dieser Neurone exprimieren TH oder AADC allein und besitzen keinen DAT. Man nennt sie monoenzymatische Neurone. Exprimieren sie TH und AADC und besitzen sie keinen DAT, nennt man sie bienzymatische Neurone. Neben dem DAT fehlt diesen Neuronen auch der vesikuläre Monoamintransporter (VMAT2), der für die Aufnahme Dopamins in die Speicher-Vesikel der Zelle verantwortlich ist. Dies wirft die Frage auf, ob und wenn ja wie diese Neurone ihren Botenstoff freisetzen und speichern. Diese nicht-dopaminergen Neurone mit dopaminergen Charakter sind überall im adulten Säugetier-Gehirn verbreitet (Cortex, rostrales Vorderhirn, Hypothalamus, Striatum, basales Vorderhirn, Globus pallidus, Mittelhirn inklusive SN, Hirnstamm, Kleinhirn, thalamischer paraventriculärer Nukleus, Habenula und parabrachialer Nukleus). In manchen Regionen sind sie zahlreicher als die echten dopaminergen Neurone. Sie haben diese Eigenschaft immer oder vorübergehend unter bestimmten (patho-)physiologischen Bedingungen (Ugrumov 2009). In der SN gibt es physiologisch (neben den echten TH-, AADC- und DAT-positiven dopaminergen Neuronen) sowohl TH-positive/AADC-negative als auch AADC-positiv/TH-negative Neurone (Ikemoto et al. 1998).

Die TH-positiven/AADC-negativen Neurone können Dopamin nicht herstellen. Sie stellen L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) u.a. in der SN und VTA her (Mons et al. 1989). Es existieren auch TH-positive monoenzymatische Neurone in anderen Hirnarealen, die kein L-DOPA synthetisieren, da ein Co-Faktor für die für den Zellstoffwechsel essentielle Verbindung Guanosintriphosphat (GTP) fehlt. Über die physiologische Funktion des L-DOPAs wurde spekuliert, es könne an intrazellulären Steuerfunktionen der Neurotransmitter-Synthese und -Freisetzung beteiligt sein. In den AADC-positiven/TH-negativen Neuronen ist eine Synthese von DA möglich, sobald L-DOPA als Substrat zur Verfügung steht (Ugrumov 2009).

Den monoenzymatischen AADC- und TH-Neuronen fehlen VMAT2 und DAT. Da es aber belegt wurde, dass Dopamin bzw. L-DOPA von diesen Neuronen synthetisiert wird, muss die

Speicherung und Freisetzung anderen bisher unbekanntem Mechanismen unterliegen. Es wurden Hypothesen über nicht-exozytotische Freisetzung aufgestellt (Ugrumov 2009, Weihe et al. 2006).

Ugrumov lieferte viele Hinweise, dass die TH- und AADC-monoenzymatischen Neurone sich mit ihrer Enzym-Ausstattung ergänzen und eine Dopamin-produzierende funktionelle Einheit bilden (Ugrumov 2009). Dabei würden das von den TH-Neuronen synthetisierte L-DOPA in den synaptischen Spalt entlassen und von den nahegelegenen Dopamin-produzierenden AADC-Neuronen aufgenommen. Schneider und Kollegen belegten, dass L-DOPA auch weite Entfernungen in interzellulären Spalten zurücklegt (Schneider et al. 1994). Ugrumov und Kollegen lieferten 2004 den wichtigsten Beleg für ihre These der kooperativen Synthese von Dopamin (Ugrumov et al. 2004, Abb. 31). Es wurde im Nucleus arcuatus (arcuate nucleus, AN) von 21 Tage alten Ratten-Feten mittels kompetitiver Hemmung die L-DOPA-Aufnahme der monoenzymatischen AADC-Neurone verhindert. Das Überangebot an L-Tyrosin führte im AN zu einem signifikanten Absinken der Dopamin-Synthese und in der SN desselben Tieres zu einer Erhöhung der DA-Synthese.

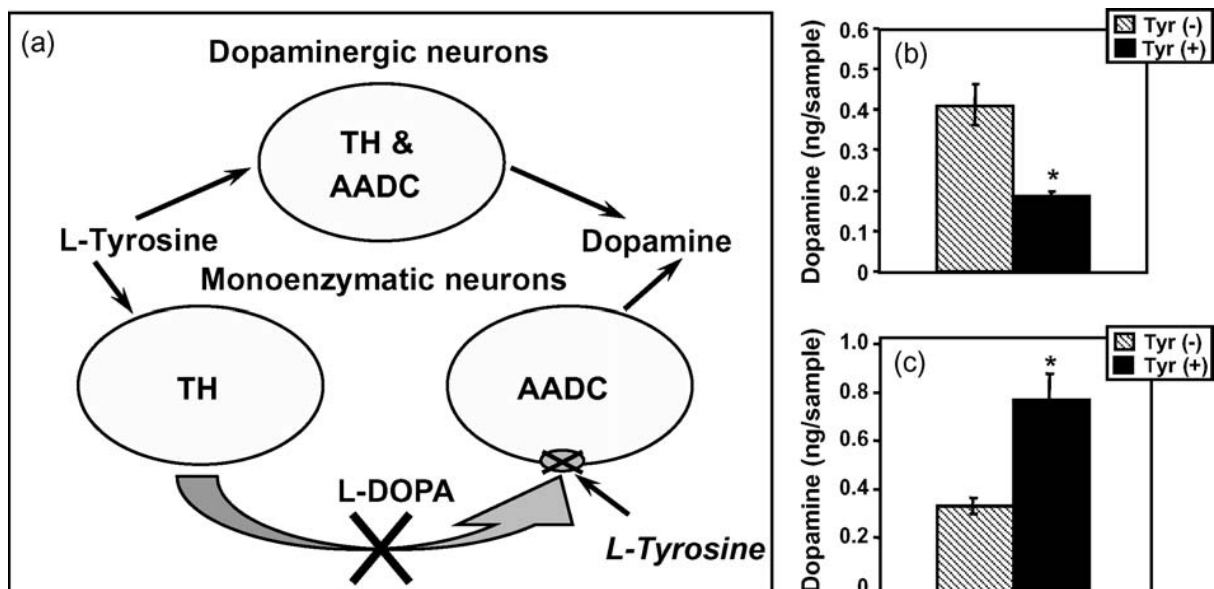


Abb. 31

- (a) Schematische Darstellung der Studie von Ugrumov et al. 2004., die die Hypothese der gemeinsamen Dopamin-Synthese von monoenzymatischen TH- und AADC-Neuronen belegt. Das von den monoenzymatischen TH-Neuronen gebildete L-DOPA kann von den monoenzymatischen AADC-Neuronen nicht mehr aufgenommen werden, da der L-DOPA-Transporter kompetitiv mit L-Tyrosin gehemmt wurde.

- (b) Das Überangebot von L-Tyrosin führte im Nucleus arcuatus der verwendeten Ratten-Feten (P 21) zu einem signifikanten Abfall der DA-Synthese und  
(c) in der SN desselben Tieres zu einem signifikanten Anstieg der Dopamin-Synthese.**

**Der AN ist reich an monoenzymatischen TH- und AADC-Neuronen und in der SN überwiegt die Zahl der echten SN-Neurone.**

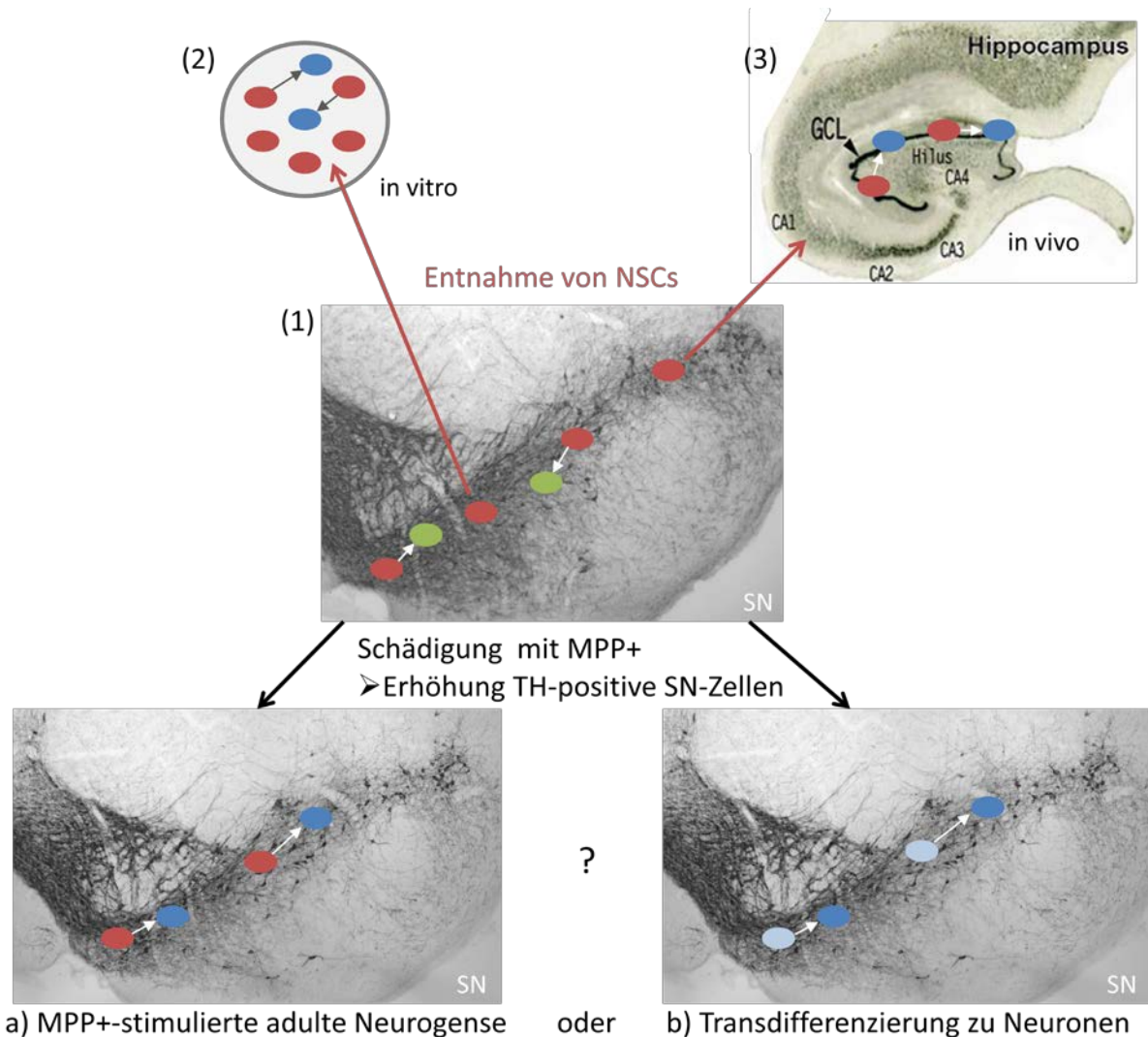
**(Quelle: Ugrumov et al. 2004)**

Als Funktion der kooperativen Synthese wurde ein kompensatorischer Prozess vermutet, der durch chronische Insuffizienz dopaminerger Neurone verstärkt oder ausgelöst werden kann (Ugrumov et al. 2002). Neurotoxikologisch ausgelöste dopaminerge Degeneration im AN führte zuerst zu einem 50%igen Verlust der dopaminerger Neurone, dann zu einem 50%igen Abfall der Dopamin-Synthese und schließlich zu einem Anstieg der monoenzymatischen TH- und AADC-Neuronen mit gleichzeitiger Wiederherstellung der Dopamin-Synthese (Ershov et al. 2005, Ziyazetdinova et al. 2008). Im Striatum wurden entsprechende Reaktionen nach Degeneration dopaminerger SN-Neurone gezeigt (Betarbet et al. 1997, Cossette et al. 2005). Auch Tandé et al. 2006 lösten mit ihrem dopaminergen MPTP-Degenerationsmodell an Rhesusaffen einen Anstieg TH-positiver Zellen im Striatum aus. Sie belegten, dass es sich bei den „neuen“ Zellen mit dopaminergen Charakter um ursprünglich striatale Interneurone handelte. Sie hätten sich einer phänotypischen Verwandlung unterzogen. Es wurde gezeigt, dass die TH-positiven Zellen keinen neurogenetischen Ursprung hatten, da keine der mit BrdU markierten Zellen gleichzeitig mit einem von drei neuronalen Markern (NeuN, GAD-67 und TH) gefärbt werden konnte. Außerdem hatten sie eine Positiv-Kontrolle mit BrdU/NeuN-gefärbten Zellen aus dem Gyrus denatus, um zu belegen, dass das angewendete Versuchs-Protokoll funktioniert. Mit einer Reihe von Antikörper-Färbungen konnte eindeutig der Charakter dieser Neurone als dopaminerge Interneurone bestimmt werden. Dieser Prozess wurde von den Autoren als Reaktion auf den durch MPTP-Gabe ausgelösten Dopamin-Mangel im Striatum gedeutet. Sie widersprachen der naheliegenden These, dass neugeborene Neurone aus neurogenen Nischen eingewandert sein könnten.

Auf das hier etablierte neurotoxikologische Mausmodell ließe sich übertragen, dass es sich bei dem Anstieg TH-positiver Neurone in der SN nach Toxin-Gabe um eine kompensatorische Reaktion auf eine dopaminerge Schädigung handelte. Diese Schädigung könnte mit einer Transdifferenzierung von Interneuronen in der SN zu TH-positiven Neuronen kompensiert worden sein.

Diese These könnte geprüft werden, in dem man in einem weiteren Versuch die „neuen“ TH-positiven Zellen auf ihren neurochemischen Charakter untersucht. Dies wäre mit einem gleichzeitigen immunocytochemischen Nachweis von TH, AADC, DAT und VMAT2 denkbar. Auch das Messen der Dopamin-Synthese könnte aufschlussreich sein, insofern dass die Dopamin-Synthese direkt nach Toxin-Gabe abfallen und durch die angelaufene Kompensation wieder steigen würde.

Basierend auf dem Diskutierten kommen sowohl die Transdifferenzierung zu TH-positiven Interneuronen als auch die MPP<sup>+</sup>-stimulierte Neurogenese als mögliche Erklärung für die nach dopaminergischer Schädigung aufgetretene Erhöhung TH-positiver Neurone in Betracht. In Abb.32 wurden diese beiden diskutierten Erklärungsmöglichkeiten schematisch dargestellt.



**Abb. 32** Darstellung der Proliferation neuronaler Stammzellen (NSC) (1) in der Substantia nigra (SN) unter normalen Bedingungen (2) nach Entnahme in vitro, (3) nach Entnahme in vivo und Darstellung der zwei diskutierten Erklärungen der nach dopaminergem Schädigung aufgetretenen Erhöhung der TH-positiven Neuronen: a) MPP<sup>+</sup>-stimulierte adulte Neurogenese und b) Transdifferenzierung zu TH-positiven Neuronen.

In der normalen adulten SN (1) existieren NSCs (rot), die durch noch größtenteils unerforschte Signale im Umgebungsmilieu der SN daran gehindert werden zu dopaminergen Neuronen zu differenzieren. Der überwiegende Teil der NSCs in der SN reift zu Gliazellen (grün) aus. Entnimmt man diese NSCs aus der SN sind sie sowohl in vitro (2) als auch in vivo (3) in der Lage zu Neuronen (blau) zu werden.

(Quelle: Lie et al. 2002)

Das von uns etablierte MPP<sup>+</sup>-Schädigungsmodell löste eine Erhöhung der Zellzahl TH-positiver SN-Neurone aus. Die zwei diskutierten Erklärungsmöglichkeiten sind mit a) und b) dargestellt. Die dopaminerge Schädigung könnte a) in der SN adulte Neurogenese stimuliert haben, d.h. NSCs entwickeln sich zu TH-positiven Neuronen oder b) Interneurone (hellblau) transdifferenzieren zu TH-positiven Neuronen.

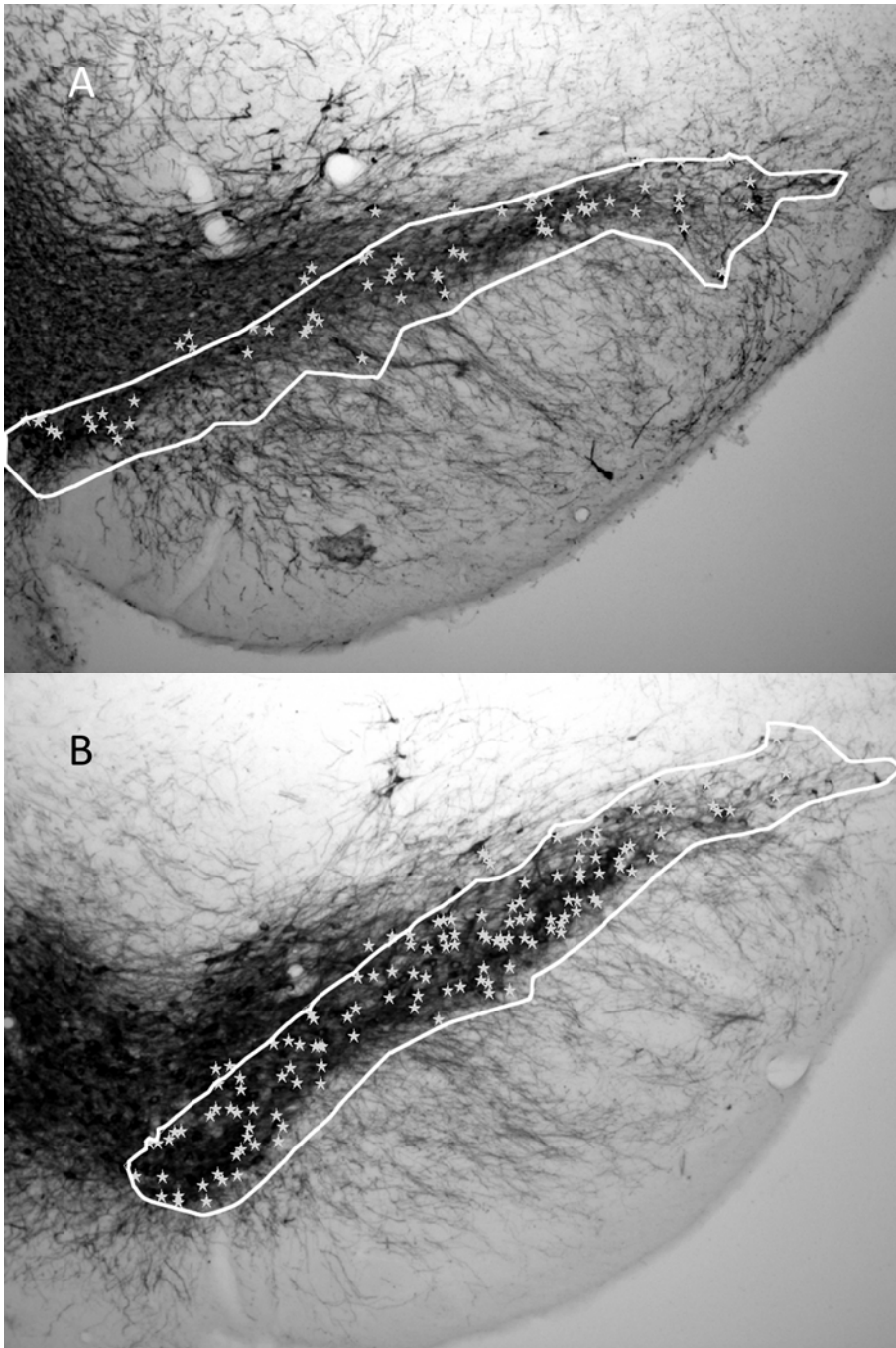


**Der Unterschied in der dendritischen Dichte zwischen normaler SN (1) und geschädigter (2) ist hier ebenfalls zu erkennen.**

### **4.2.3. Die Möglichkeit eines Auswertungsfehlers**

Neben den beiden diskutierten biologischen Erklärungsmöglichkeiten besteht außerdem prinzipiell die Möglichkeit, dass ein Auswertungsfehler vorlag. Bei der Durchführung der Stereo-Investigator-Analyse wird die SN wie bereits beschrieben dreidimensional nach bestimmten Regeln abgesucht und die TH-positiven Neurone, die innerhalb der zu zählenden Bereiche liegen, werden markiert. Das Programm errechnet aus den tatsächlich gezählten Neuronen und anderen Faktoren die geschätzte Gesamtzahl TH-positiver SN-Neuronen. Es gibt Bereiche der SN (vor allem die mediale SNc), die eine sehr hohe Neuronen-Dichte aufweisen. In diesen Bereichen ist es schwieriger die einzelnen Zellsomata zu identifizieren, da es viele Somata- wie auch dendritische Überlagerungen gibt. Dendritischer Rückzug könnte dazu geführt haben, dass zusätzlich einige Somata erkennbar wurden. Dies hätte zu einem scheinbaren Anstieg der TH-positiven SN-Neurone in der Gruppe der mit MPP<sup>+</sup> behandelten Tiere führen können, begrenzt allerdings auf die mediane SN.

Da wir eine globale Zunahme der TH-positiven SN-Neurone in allen Bereichen der SN registriert haben (Abb. 33), können wir die Möglichkeit eines stereologischen Auswertungsfehlers verwerfen und favorisieren eine der beiden oben genannten biologischen Prozesse als Grund für eine Zunahme der TH-positiven SN-Neurone.



**Abb. 33** Bilder koronarer TH-positiver Mittelhirn-Schnitte einer mit ACSF behandelten (A) und einer mit MPP<sup>+</sup>/Dos3 (B) behandelten C57Bl/6-Maus und gleichzeitige Darstellung der in dem Programm Stereoinvestigator angelegten region of interest und der Markierungen der gezählten Neurone

Die 30 µm dicken Schnitte wurden auf Höhe von Bregma -3,06 mm angefertigt.

Man erkennt die durchschnittlich 41% -ige Zellzahlerhöhung bei Bregma -3,06 mm der MPP<sup>+</sup>/Dos3-Gruppe gegenüber der ACSF/Kontroll-Gruppe. Auch die beobachtete geringere Dendriten-Dichte der MPP<sup>+</sup>/Dos3-Tiere ist zu erkennen.

## 5 Zusammenfassung

Das dopaminerge Mittelhirnsystem reguliert essentielle Funktionen des Organismus: Willkürmotorik, Kognition, Motivation und Emotion, sowie Aufmerksamkeit, assoziatives und Belohnungs-Lernen. Ein Hauptmerkmal des Morbus Parkinson, der zweithäufigsten neurodegenerativen Erkrankung des Menschen, ist die progressive Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra und der daraus resultierende Dopamin-Mangels im Striatum. Dies verändert vorrangig denjenigen Regelkreis der Basalganglien, der maßgeblich für die Willkürmotorik verantwortlich ist, und führt zu den bei Morbus Parkinson typischen klinischen Symptomen: Ruhetremor, Verlangsamung der Bewegungen (Bradykinesie), Muskelsteifheit (Rigor) der Extremitäten und des Rumpfes, mangelnde Stabilität der aufrechten Körperhaltung (posturale Instabilität) und verringerte Gesichtsmimik.

Ziel dieser Studie war es, ein verbessertes chronisch-neurotoxikologisches Mausmodell zu etablieren. Unter Verwendung einer osmotischen Pumpe sollten kontinuierlich niedrige Mengen des aktiven Metaboliten 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium-Ion (MPP<sup>+</sup>) in den lateralen Ventrikel der Versuchstiere infundiert werden. Wiederholte Injektionen und die damit verbundenen Komplikationen (erhöhte Nebenwirkungen und Mortalität bedingt durch intermittierend hohe Toxin-Dosen und vermehrter Stress für die Tiere) würden dadurch entfallen. Gleichzeitig sollte dieses verbesserte Mausmodell möglichst viele pathologische und klinische Merkmale des Morbus Parkinson abbilden. Die Erwartung an den Ausgang des Versuchs war, eine chronische Degeneration dopaminergener Zellen zu initiieren, um diesen Aspekt der Parkinson Erkrankung beim Menschen möglichst ähnlich nachzubilden. Dies würde die Erprobung neuer Therapieansätze im Tiermodell deutlich verbessern.

Das zentrale Ziel dieser Studie, eine chronische Degeneration dopaminergener Zellen zu initiieren, konnte nicht erreicht werden. Stattdessen wurde eine signifikante Erhöhung TH-positiver Neuronen in der SN bei gleichzeitiger Schädigung der Axone im Striatum nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei mögliche biologische Mechanismen, die die überraschenden Befunde erklären könnten, diskutiert:

- (1) *Adulte Neurogenese*: Unser Experiment könnte zwar wie erwartet eine milde Degeneration dopaminergere SN-Zellen verursacht haben, aber gleichzeitig auch eine kompensatorische Proliferation und Ausdifferenzierung von neuronalen Stammzellen in der Substantia nigra zu TH-positiven Nervenzellen stimuliert haben. Dies wäre auch bezüglich des zeitlichen Rahmens unserer Experimente (28 Tage) eine plausible Möglichkeit, da die vollständige Ausdifferenzierung von neuronalen Stammzellen zu reifen dopaminergen Nervenzellen *in vivo* etwa drei Wochen benötigt (Zhao und Lang 2009, Gould 2007). Auch eine Migration von Stammzellen in die SN, die ausgelöst durch die neurodegenerative Schädigung vermehrt in Stammzellnischen gebildet wurden, wäre denkbar (Curtis et al. 2007). Die in unserem Versuchsmodell „angereicherte Umgebung“ der Mäuse und die auf Stress-Minimierung angelegten Versuchsbedingungen könnten sich positiv auf eine adulte Neurogenese ausgewirkt haben (Kempermann et al. 1997, Trejo et al. 2001, Fabel et al. 2003, Bischofsberger & Schmidt-Hieber 2006).
- (2) *Transdifferenzierung zu TH-positiven Neuronen*: Es könnte sich bei dem Anstieg TH-positiver Neurone in der SN nach Toxin-Gabe um eine kompensatorische Reaktion auf eine dopaminerge Schädigung gehandelt haben. Diese Schädigung könnte mit einer Transdifferenzierung von GABAergen Interneuronen in der SN zu TH-positiven Neuronen kompensiert worden sein (Ugrumov et al. 2004).

Zum Nachweis adulter Neurogenese wäre ein Folgeversuch interessant, beim dem unter gleichen Bedingungen mit Tieren, die die höchste der hier verwendete MPP<sup>+</sup>-Dosierungen (0,3 mg/kg/d) erhalten, das Ausmaß der Ko-Lokalisation des Mitose-Markers Bromodesoxyuridine (BrdU) in TH-positiven SN Neuronen quantifiziert würde.

Belege für die Transdifferenzierung zu TH-positiven Zellen könnte man mit Untersuchungen der TH-positiven Zellen auf ihren neurochemischen Charakter erhalten, d.h. gleichzeitige immunocytochemische Nachweise von TH, AADC, DAT und VMAT.

Das Ziel der Studie die Mortalität und Belastung der Versuchstiere zu reduzieren wurde erreicht. Dazu trugen Stressreduktion, Gruppenhaltung und „angereicherte Umgebung“ zum

einen und Vermeidung regelmäßiger Injektionen hoher Toxindosen zum anderen maßgeblich bei.

## 6 Summary

The dopaminergic midbrain system is crucial for regulating voluntary motor movements and essential brain functions like cognition, motivation and emotion, as well as attention, associative and reward learning. The progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra and the corresponding lack of dopamine in the striatum causes the characteristic motor symptoms of Parkinson's Disease – the second most common neurodegenerative disease in humans. Thus, the basal ganglia system is severely impaired and leads to the typical clinical symptoms of Parkinson's disease: resting tremor, bradykinesia, stiffness of muscles and extremities, postural instability and reduced facial mimic.

The aim of this study was to establish an optimized chronic neurotoxicological model in mice. Using an osmotic pump, small amounts of the active metabolite 1-methyl-4-phenylpyridinium-ion (MPP<sup>+</sup>) were constantly infused into the right lateral ventricle. The stress and side effects for the mice caused by repeated injections (intermittent high toxin doses) could be prevented. At the same time this optimized mouse model should represent as many as possible pathological and clinical features of Parkinson's disease. The experiment's expectation was to initiate a chronic degeneration of dopaminergic cells to reproduce this aspect as similar as possible to the human disease of Parkinson. This would improve the testing of new therapies in animal models.

The main aim of this study – initiating a chronic degeneration of dopaminergic cells – was not achieved. Instead, a significant increase in TH-immunopositive substantia nigra neurons was found along with an axonal damage in the striatum.

There are two possible biological mechanisms discussed that could explain the surprising findings:

- (1) *Adult neurogenesis*: As expected our experiment might have caused a mild degeneration of dopaminergic substantia nigra neurons. At the same time this might have stimulated compensatory proliferation and differentiation of neuronal stem cells into TH-positive neuronal cells in the substantia nigra. Concerning the duration of our experiment (28 days) this is a plausible explanation. The complete

differentiation from neuronal stem cells into mature dopaminergic neuronal cells *in vivo* takes about three weeks (Zhao und Lang 2009, Gould 2007). Another possibility would be that initiated by mild neurodegenerative damage neuronal stem cells migrated into the substantia nigra (Curtis et al. 2007). The “enriched environment” and reduced stress level for the mice in our experiment could have contributed to adult neurogenesis (Kempermann et al. 1997, Trejo et al. 2001, Fabel et al. 2003, Bischofsberger & Schmidt-Hieber 2006).

(2) *Transdifferentiation into TH-positive neurons*: Alternatively, the increase of the number of TH-positive neurons in the substantia nigra after toxin infusion could be explained by a compensatory reaction to dopaminergic damage in which transdifferentiation of GABAergic interneurons in the substantia nigra into TH-positive neurons might have occurred (Ugrumov et al. 2004).

To confirm adult neurogenesis future experiments, in which under the same conditions, using animals that were treated with the highest MPP<sup>+</sup>-dose as used here (0,3 mg/kg/d), the degree of co-localisation of the established mitosis marker 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and TH in substantia nigra neurons is measured, should be performed.

Evidence for transdifferentiation of TH-positive cells could be conceived by analyzing the neurochemical character of TH-positive cells, e.g. simultaneous immunohistochemical proof of the dopaminergic identity using established markers like aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine transporter, along with TH expression.

The aim of the study to reduce the mortality and stress to the experimental mice was achieved. This was contributed to the reduced stress level and housing in groups with environmental enrichment on the one hand, and avoiding of regular injections of high toxin doses on the other hand.

## Literaturverzeichnis

**Abdulwahid Arif I. & Ahmad Khan H.**

Environmental toxins and Parkinson's disease: Putative roles of impaired electron transport chain and oxidative stress

*Toxicology and Industrial Health* 26(2), 121–128 (2010)

**Altman, J. & Das, G. D.**

Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.

*J. Comp. Neurol.* 124, 319–335 (1965)

**Altman, J.**

Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.

*J. Comp. Neurol.* 137, 433–457 (1969)

**Altman, J.**

Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats.

*Anat. Rec.* 145, 573–591 (1963)

**Alvarez-Buylla, A. & Nottebohm, F.**

Migration of young neurons in adult avian brain.



*Nature* 335, 353–354 (1988)

**Alvarez-Buylla, A., Theelen, M., Nottebohm, F.**

Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during, and after song learning.

*Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 8722–8726 (1988)

**Alvarez-Fischer, D., Guerreiro, S., Hunot, S., Saurini, F., Marien, M., Sokoloff, P., Hirsch, E.C., Hartmann, A., Michel, P.P.**

Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid.

*J Neurochem.*, 107(3), 701-11 (2008)

**Bedard, A. & Parent, A.**

Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb.

*Dev. Brain Res.* 151, 159–168 (2004)

**Bischofsberger & Schmidt-Hieber**

Adult Neurogenesis in the Hippocampus.

*Neuro Forum* 3.06 (2006)

**Björklund A. & Dunnett S.B.**

Dopamine neuron system in the brain: an update

*Trends Neurosci* 30, 194-202 (2007)

**Carlsson, A., Falck, B., Hillarp, N.-A.**

Cellular localization of brain monoamines.

*Acta Physiol. Scand. Suppl.* 56, 1–28 (1962)

**Corotto, F. S., Henegar, J. R. & Maruniak, J. A.**

Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse.

*Neuroscience* 61, 739–744 (1994)

**Curtis, M. A., Faull, R.L.M., Eriksson, P.S.**

Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension.

*Science* 315, 1243–1249 (2007)

**Dahlström, A. & Fuxe, K.**

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.* 232, 1–55 (1964)

**Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., Graybiel, A.M.**

The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry.

*Brain* 122 (8), 1421-36 (1999)

**Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., Graybiel, A.M.**

The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease.

*Brain* 122 (8), 1437-48 (1999)

**Dauer, W. & Przedborski, S.**

Parkinson's disease: mechanisms and models.

*Neuron* 39, 889-909 (2003)

**Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H.**

Neurogenesis in the adult human hippocampus.

*Nature Med.* 4, 1313–1317 (1998)

**Falck, B., Hillarp, N.-A., Thieme, G., Torp, A.**

Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde.

*J. Histochem. Cytochem.* 10, 348–354 (1962)

**Fearnley, J.M. & Lees, A.J.**

Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity.

*Brain* 114, 2283-301 (1991)

**Fornai, F., Schlüter, O.M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C.L., Pontarelli, F., Battaglia, G., Pellegrini, A., Nicoletti, F., Ruggieri, S., Paparelli, A., Südhof, T.C.**

Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein.

*Proc Natl Acad Sci USA* 102(9), 3413-8 (2005)

**Frielingsdorf, H., Schwarz, K., Brundin, P., Mohapel, P.**

No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra.

*Proc Natl Acad Sci USA* 101, 10177–82 (2004)

**Goldman, S. A. & Nottebohm, F.**

Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain.

*Proc. Natl Acad. Sci. USA* 80, 2390–2394 (1983)

**Gould E.**

How widespread is adult neurogenesis in mammals?

*Nat Rev Neurosci* 8, 481–488 (2007)

**Gunderson, H.J.**

Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimator and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson.

*J. Microsc.* 143, 3-45 (1986)

**Hardy J.**

Genetic analysis of pathways to Parkinson disease.

*Neuron* 68(2), 201-6 (2010)

**Höglinger, G.U., Carrad, G., Michel, P.P., Medja, F., Lombès, A., Ruberg, M., Friguet, B., Hirsch, E.C.**

Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease.

*Journal of Neurochemistry* 86, 1297–1307 (2003)

**Höglinger G.U., Rizk, P., Murie, I M.P., Duyckaerts, C., Oertel, W.H., Caille, I.**

Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease.

*Nat Neurosci* 7, 726–35 (2004)

**Hökfelt, T., Mårtensson, R., Björklund, A., Kleinau, S., Goldstein M.**

Distributional of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the rat brain.

*Handbook of Chemical Neuroanatomy (Classical Transmitters in the CNS, Part I) (Vol. 2)*

(Björklund, A. and Hökfelt, T., eds) pp. 277–379, Elsevier (1984)

**Ikemoto, K., Nagatsu, I., Nishimura, A., Nishi, K., Arai, R.**

Do all human midbrain neurons synthesize dopamine?

*Brain Research* 805, 255-258 (1998)

**Ishihara, L.S., Cheesbrough, A., Brayne, C., Schrag, A.**

Estimated life expectancy of Parkinson's patients compared with the UK population.

*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78, 1304-9 (2007)

**Kaplan, M. S.**

Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex.

*J. Comp. Neurol.* 195, 323–338 (1981)

**Kaplan, M. S. & Hinds, J. W.**

Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs.

*Science* 197, 1092–1094 (1977)

**Kaplan, M. S. & Bell, D. H.**

Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus.

*J. Neurosci.* 4, 1429–1441 (1984)

**Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H.**

More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment.

*Nature* 386, 493–5 (1997)

**Keuker, J.I., Vollmann-Honsdorf, G.K., Fuchs, E.**

How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 region of tree shrews.

*Brain Res. Prot.* 7, 211-21 (2001)

**Lammel, S.**

Expressionsanalyse der Kaliumkanal  $\beta$ -Untereinheit KChIP4 in dopaminergen Mittelhirnneuronen.

*Diplomarbeit* (2004)

**Lie, D.C., Dziewczapolski, G., Willhoite, A.R., Kaspar, B.K., Shults, C.W, Gage, F.H.**

The Adult Substantia Nigra Contains Progenitor Cells with Neurogenic Potential

*Journal of Neuroscience* 22(15), 6639–6649 (2002)

**Liss, B., Haeckel, O., Wildmann, J., Miki, T., Seino, S., Roeper, J.**

K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons.

*Nature Neuroscience* 8, 1742 - 1751 (2005)

**Lois, C. & Alvarez-Buylla, A.**

Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain.

*Science* 264, 1145–1148 (1994)

**Mons, N., Tison, F., Geffard, M.**

Identification of L-dopa-dopamine and L-dopa cell bodies in the rat mesencephalic dopaminergic cell systems.

*Synapse* 4, 99–105 (1989)

**Mohapel P, Frielingsdorf H, Haggblad J, Zachrisson O, Brundin P.**

Platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induce striatal neurogenesis in adult rats with 6-hydroxydopamine lesions.

*Neuroscience* 132, 767–76 (2005)

**Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W.C., LaMantia A.S., McNamara J.O.,**

**Williams S.M.**

Neuroscience.

*Third Edition, Sinauer Associates* (2004)

**Rakic, P.**

Limits of neurogenesis in primates.

*Science* 227, 1054–1056 (1985)

**Ries, V., Depboylu, C., Arias-Carrión, O., Oertel, W.H., Höglinger, G.U. M.**

Parkinson-Zukünftige Therapieoptionen aus der Grundlagenforschung.

*Neuroforum* 3, 234-241 (2008)



**Sanai, N., Tramontin, A.D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-García Verdugo, J., Berger, M.S., Alvarez-Buylla, A.**

Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neuronal stem cells but lacks chain migration.

*Nature* 427, 740–744 (2004)

**Sanyal, J., Chakraborty, D. P., Sarkar, B., Banerjee, T.K., Mukherjee, S.C., Ray, BC, Rao, V.R.**

Environmental and Familial Risk Factors of Parkinsons Disease: Case-Control Study.

*Can J of Neurol Sci.* 37 (5), 555-6 (2010)

**Schultz, W.**

Predictive reward signal of dopamine neurons.

*J Neurophysiol* 80 (1), 1-27 (1998)

**Schultz, W.**

Getting formal with dopamine and reward.

*Neuron* 36(2), 241-263 (2002)

**Shan, X., Chi L., Bishop, M., Luo, C., Lien, L. Zhang, Z., Liu, R.**

Enhanced de novo neurogenesis and dopaminergic neurogenesis in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease-like mice

*Stem Cells* 24(5), 1280-7 (2006)

**Tan, E.-K, Tan, C., Fook-Chong, S. M. C., Lum, S. Y., Chai, A., Chung, H., Shen, Zhao, H., Teoh, M. L., Yih, Y., Pavanni, R., Chandran, V. R., Wong, M. C..**

Dose-dependent protective effect of coffee, tea, and smoking in Parkinson's disease: a study in ethnic Chinese.

*Journal of the Neurological Sciences* 216, 163– 167 (2003)

**Tandé, D., Höglinger G., Debeir, T., Freundlieb, N., Hirsch, E.C., Francois, C.**

New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis.

*Brain* 129, 1194–2000 (2006)

**Trepel, M.**

Neuroanatomie, Struktur und Funktion.

*2. Auflage, Urban & Fischer (1999)*

**Ugrumov, M.V.**

Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: Distribution in the brain, development and functional significance.

*Journal of Chemical Neuroanatomy* 38, 241-256 (2009)

**Voorn, P., Vanderschuren, L.J., Groenewegen, H.J., Robbins, T.W, Pennartz, C.M.**

Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum.

*Trends Neurosci.* 27(8), 468-74 (2004)

**West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J.**

Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator.

*Anat. Rec.* 231, 482-97 (1991)

**Winner B., Geyer, M., Couillard-Despres, S., Aigner, R., Bogdahn, U., Aigner, L., Kuhn, G., Winkler, J.**

Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb.

*Exp Neurol* 197, 113–21 (2006)

**Yamada M., Onodera M., Mizuno Y., Mochizuki H.**

Neurogenesis in olfactory bulb identified by retroviral labeling in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated adult mice.

*Neuroscience* 124, 173–81 (2004)

**Yazdani U., German, D.C., Liang, C.-L., Manzano, L., Sonsalla, P.K., Zeevalk, G.D.**

Rat model of Parkinson's disease: Chronic central delivery of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+).

*Experimental Neurology* 200, 172-183 (2006)

**Zoli, M. & Agnati, L.F.**

Wiring and volume transmission in the central nervous system: The concept of closed and open synapses.

*Progress in Neurobiology* 49, 363-380 (1996)

## Veröffentlichung

**Gisbert, S., Ricciardi, F., Kurz, A., Azizov, M., Hoepken, H.-H., Becker, D., Voos, W., Leuner, K., Müller, W.E., Kudin, A.P., Kunz, W.S., Zimmermann, A., Roeper, J., Wenzel, D., Jendrach, M., [...] Auburger, G.**

Parkinson Phenotype in Aged PINK1-Deficient Mice Is  
Accompanied by Progressive Mitochondrial Dysfunction  
in Absence of Neurodegeneration

*Plos One* 4(6): e5777. doi:10.1371/journal.pone.0005777 (2009)

## Erklärung

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

Annabelle Zimmermann

Oberursel, 11.6.2013

## Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinen Betreuern. Herrn Prof. Roeper für die Aufnahme einer Veterinärmedizinerin in seine Arbeitsgruppe, die gute Betreuung und die schöne Zeit dort. Das wissenschaftliche Arbeiten war eine interessante und lehrreiche Erfahrung, die sie mir ermöglicht haben und die ich nicht missen möchte. Herrn Prof. Diener danke ich für die Annahme als Doktorandin und die hilfreichen Anregungen zu meiner Promotionsarbeit.

Ganz lieben Dank geht auch an Herrn Prof. Failing. Seine Bereitschaft mir bei der statistischen Auswertung meiner Daten zu helfen, trug sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Meinen Kollegen der AG Neurophysiologie gilt mein Dank für die tollen drei Jahre am Institut. Ich bedanke mich bei Euch für Eure Hilfe und unsere fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit sowie für Eure Freundschaft.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, insbesondere bei meinen Eltern und meinem Bruder, meinen Männern Sonny und Joe, bei Felix, Christa, Ulrich und Ulla. Ohne Euren Rückhalt hätte ich weder die Zeit der Promotion, noch die Zeit der Praxiseröffnung geschafft.