

Aus der Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

In vivo Elektrophysiologie im Parkinson-Modell der Ratte:
Einfluss akuter und chronischer Dopamindepletion auf die
Netzwerkaktivität der Kortex-Basalganglienschleife

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maximilian Heinz Beck
aus Rosenheim

Datum der Promotion:

02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt.....	3
1.1 Abstrakt.....	3
1.2 Abstract.....	5
2. Eidesstattliche Versicherung.....	7
3. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation.....	8
4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)....	10
5. Druckexemplar der ausgewählten Publikation	11
6. Lebenslauf	30
7. Komplette Publikationsliste.....	32
8. Danksagung.....	33

1. Abstrakt

1.1 Abstrakt

Hintergrund: Das idiopathische Parkinson-Syndrom (iPS) ist eine neurodegenerative Erkrankung, deren motorische Kardinalsymptome maßgeblich durch einen chronischen Dopaminmangel in den Basalganglien verursacht werden. Neben der dopaminergen Pharmakotherapie hat sich die Tiefe Hirnstimulation (THS) als Standardtherapie des fortgeschrittenen iPS etabliert. Elektrophysiologische Untersuchungen an iPS-Patienten mit implantierten THS-Elektroden zeigten, noch vor Beginn der THS, eine auffällig gesteigerte Synchronität neuronaler Netzwerke der Kortex-Basalganglienschleife im Beta-Frequenzspektrum (13-35 Hz), so genannte Beta-Oszillationen. Klinische Studien lassen einen Zusammenhang zwischen eben diesen Beta-Oszillationen und den motorischen Kardinalsymptomen des iPS vermuten. Die potentiell pathologische Bedeutung der Beta-Oszillationen wurde jedoch wiederholt durch tierexperimentelle Arbeiten in Frage gestellt, in denen ein akutes pharmakologisch induziertes Dopamindefizit nicht mit gesteigerter Beta-Aktivität einherging. Um den Zusammenhang zwischen Dopaminmangel, motorischem Defizit und Beta-Oszillationen weiter zu untersuchen, charakterisierten wir in der hier vorliegenden Studie zwei iPS-Modelle, die sich in der zeitlichen Entwicklung ihres Dopamindefizits maßgeblich unterscheiden: das akute Reserpin-Modell und das chronische 6-Hydroxydopamin-(6-OHDA) Modell der Ratte.

Methode: Nach standardisierter motorischer Verhaltensuntersuchung (Drag-, Zylinder- und Bar-Test) wurden die einzelnen Versuchsgruppen zum Zeitpunkt ihres jeweils maximal ausgeprägten Dopaminmangels elektrophysiologisch in Urethan-Narkose charakterisiert: Reserpin (n=9) 18 Stunden nach Applikation, 6-OHDA (n=9) 20-30 Tage nach stereotaktischer Injektion und gesunde Kontrollen (n=9) unmittelbar nach Eingang in den Versuch. Hierzu leiteten wir in vivo simultan aus dem primären Motorkortex, dem Nucleus subthalamicus (STN) und der Substantia nigra pars reticulata (SNr) lokale Feldpotentiale und Multi-Unit-Aktivität ab. Wir analysierten Powerspektren, Kohärenz und Spike Triggered Waveform Averages (STWAs). Die korrekte Elektrodenpositionierung und das Ausmaß des dopaminergen Zelluntergangs wurden nach Versuchsende histologisch verifiziert.

Ergebnisse: Beide iPS-Modelle wiesen eine ausgeprägte Akinese auf. Reserpin und 6-OHDA zeigten beide, im Vergleich zu Kontrollen, gesteigerte Beta-Power in den Basalganglien, unterschieden sich aber hinsichtlich ihrer dominierenden Frequenz deutlich: Während für 6-OHDA der Beta-Peak im unteren Beta-Spektrum (STN 17Hz; SNr 15Hz) lag, war der Beta-Peak für Reserpin hingegen im oberen Beta-Spektrum lokalisiert (STN 27Hz; SNr 28Hz). Nur für 6-OHDA lädierte Tiere konnte eine gesteigerte Beta-Aktivität im primären Motorkortex nachgewiesen werden. Beide Modelle zeigten eine erhöhte Beta-Kohärenz zwischen Kortex und Basalganglien. Subthalamische Beta-STWAs waren nur in der 6-OHDA Gruppe erhöht.

Schlussfolgerung: In der hier vorliegenden Arbeit können wir zeigen, dass sowohl ein akutes als auch ein chronisches Dopamindefizit mit Beta-Oszillationen und einem motorischen Defizit einhergehen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese eines pathophysiologischen Zusammenhangs zwischen gesteigerter Beta-Aktivität und Akinese des iPS. Somit liefert diese Studie weiteren Anhalt, Beta-Oszillationen als potentiellen Biomarker für eine verbesserte, adaptive THS in Betracht zu ziehen.

Modifiziert aus:

Beck MH, Haumesser JK, Kühn J, Altschüler J, Kühn AA, van Riesen C. Short- and long-term dopamine depletion causes enhanced beta oscillations in the cortico-basal ganglia loop of parkinsonian rats. *Exp Neurol*. 2016 Dec;286:124-136.

1.2 Abstract

Introduction: The motor symptoms of Parkinson's disease (PD) are mainly caused by a lack of dopamine in basal ganglia structures. Besides dopaminergic pharmacotherapy, deep brain stimulation (DBS) has evolved as a standard therapy for advanced PD. Abnormally synchronized brain activity in the beta range (13-35 Hz), so called beta oscillations, has been found in the cortex-basal ganglia loop of PD patients treated with DBS, before therapeutic stimulation. Recent correlative evidence suggests that these beta oscillations are related to PD motor symptoms such as akinesia. However, this hypothesis has also been repeatedly questioned by animal studies showing no changes in beta power using an acute pharmacologic dopamine blockade. To clarify the relationship between beta oscillations, motor deficit and dopamine depletion, we examined two different models of PD with a differing time course of dopamine deficiency: The acute reserpine and the chronic progressive 6-hydroxydopamine (6-OHDA) model of the rat.

Methods: After standardized assessment of the motor deficit (drag-, cylinder- and bar-test), electrophysiological recordings in urethane anesthesia were performed for each model at the maximum level of dopamine depletion: reserpine (n=9) 18 hours after application, 6-OHDA (n=9) 20-30 days after stereotactic injection; and in healthy controls (n=9). We recorded multi-unit activity and local field potential data simultaneously from the subthalamic nucleus (STN), the substantia nigra pars reticulata (SNr) and the primary motor cortex. We analyzed power spectral densities, coherence and spike triggered waveform averages (STWA). Furthermore, we histologically verified correct electrode placement and the extent of the dopaminergic cell loss.

Results: Both animal models showed profound akinesia. We found evidence for enhanced beta power in the basal ganglia of both models, but they differed substantially in respect to their main peak frequency: while the 6-OHDA peak was located in the low-beta range (STN 17Hz; SNr 15Hz), the reserpine peak appeared at higher beta frequencies (STN 27Hz; SNr 28Hz). In contrast to 6-OHDA, reserpine showed no elevation of beta power in primary motor cortex. Notably, beta coherence levels between primary motor cortex and basal ganglia nuclei were elevated in both models. Subthalamic beta STWAs were only elevated for 6-OHDA.

Conclusion: In this study both acute and chronic dopamine depletion involve the emergence of beta oscillations and motor impairment. These results further support the hypothesis of an important pathophysiological relation between enhanced beta activity and akinesia in parkinsonism. Therefore, beta oscillations can be considered as a potential biomarker for improved closed-loop DBS.

Modifiziert aus:

Beck MH, Haumesser JK, Kühn J, Altschüler J, Kühn AA, van Riesen C. Short- and long-term dopamine depletion causes enhanced beta oscillations in the cortico-basal ganglia loop of parkinsonian rats. *Exp Neurol.* 2016 Dec;286:124-136.

2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Maximilian Heinz Beck, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„In vivo Elektrophysiologie im Parkinson-Modell der Ratte: Einfluss akuter und chronischer Dopamindepletion auf die Netzwerkaktivität der Kortex-Basalganglienschleife“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 07.05.2017

Unterschrift

3. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation: Beck MH, Haumesser JK, Kühn J, Altschüler J, Kühn AA, van Riesen C. Short- and long-term dopamine depletion causes enhanced beta oscillations in the cortico-basal ganglia loop of parkinsonian rats. Exp Neurol. 2016 Dec;286:124-136.

Beitrag im Einzelnen:

Versuchsvorbereitung:

Bau von Silber/Silber-Chlorid Elektroden für die epidurale Ableitung.

Ansetzen aller für Versuche und Probenaufarbeitung benötigten Lösungen.

Versuche:

Eigenständige Durchführung aller Experimente (n=27):

- 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) Injektion in den Fasciculus medialis telencephali mittels stereotaktischer Operation.
- Engmaschige postoperative Versorgung der operierten Ratten (Gewichts-, Verhaltens- und Wundkontrolle, Injektion von Analgetika).
- Intraperitoneale Applikation von Reserpin, engmaschige Kontrolle der behandelten Tiere (Gewichts- und Verhaltenskontrolle).
- Verhaltensuntersuchung der Versuchstiere: Drag-, Zylinder- und Bar-Test
- Elektrodenimplantation (Tiefenelektroden: Nucleus subthalamicus, Substantia nigra pars reticulata; epidurale Elektroden: Primärer Motorkortex, Cerebellum) mittels stereotaktischer Operation in Urethannarkose.
- Ableitung von lokalen Feldpotentialen und Multi-Unit Aktivität aus den Zielstrukturen.
- Transkardiale Perfusion der Versuchstiere nach erfolgtem Versuch.
- Entnahme und Konservierung der Rattengehirne.

Histologische Aufarbeitung der entnommenen Gehirne:

Kryokonservierung und Kryoschnitt der entnommenen Gehirne.

Strukturell histologische Nissl-Färbung aller Proben.

Immunhistochemische Tyrosinhydroxylase-Färbung.

Datenanalyse:

Auswertung der histologischen Präparate:

- Verifizierung der Elektrodenposition und der strukturellen Integrität
- Densitometrie und Stereologie der Tyrosinhydroxylase gefärbten Gehirnschnitte

Auswertung der Video-Verhaltensdaten.

Auswertung der elektrophysiologischen Daten:

- Identifikation geeigneter Narkosezustände (activated state, slow wave activity),
- Analyse der lokalen Feldpotentiale (Power- und Kohärenz-Berechnung)
- Etablierung und Durchführung der Multi-Unit Datenanalyse (Spikesorting, Spike-Triggered Waveform Averages).

Auswertung:

Statische Auswertung der erhobenen Daten. Mithilfe bei der Interpretation der Ergebnisse.

Manuskript:

Literaturrecherche, Verfassen des Manuskriptes, Erstellung der Abbildungen, Mitbearbeitung der Revision.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)

Journal Data Filtered By: Selected JCR Year: 2015 Selected Editions: SCIE,SSCI

Selected Categories: 'NEUROSCIENCES' Selected Category Scheme: WoS

Platz 51 von 256 Journals in der Kategorie 'NEUROSCIENCES'

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
37	Social Cognitive and Affective Neuroscience	4,695	5.101	0.018340
38	HUMAN BRAIN MAPPING	17,184	4.962	0.040350
39	Molecular Autism	847	4.961	0.004500
40	NEUROPHARMACOLOGY	17,341	4.936	0.039300
41	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	16,233	4.929	0.030330
42	BIPOLAR DISORDERS	5,191	4.882	0.009570
43	NEUROBIOLOGY OF DISEASE	13,718	4.856	0.033810
44	Brain Stimulation	2,918	4.793	0.009070
44	SLEEP	16,906	4.793	0.026010
46	JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON	47,457	4.731	0.053030
47	PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY	13,117	4.704	0.027600
48	Neurotherapeutics	2,820	4.676	0.008680
49	Multiple Sclerosis Journal	8,850	4.671	0.021480
50	Journal of Neuroinflammation	6,293	4.667	0.020510
51	EXPERIMENTAL NEUROLOGY	18,603	4.657	0.028980
52	Frontiers in Cellular Neuroscience	3,841	4.609	0.016240
53	Translational Stroke Research	1,078	4.503	0.004200
54	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,133	4.483	0.006070
55	CURRENT OPINION IN NEUROLOGY	4,784	4.469	0.011510
56	JOURNAL OF PAIN	7,140	4.463	0.018370
57	EUROPEAN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	5,775	4.409	0.014350
58	JOURNAL OF NEUROTRAUMA	10,984	4.377	0.020440
59	PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY	9,666	4.361	0.017980
60	ACS Chemical Neuroscience	2,574	4.348	0.011060
60	Frontiers in Aging Neuroscience	2,422	4.348	0.009550
62	INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	5,393	4.333	0.013780
63	CORTEX	7,229	4.314	0.017830
64	HIPPOCAMPUS	8,771	4.074	0.016580
65	CNS Neuroscience & Therapeutics	2,194	4.019	0.007660

5. Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Publikation* kann unter <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.10.005> eingesehen werden.

* Beck MH, Haumesser JK, Kühn J, Altschüler J, Kühn AA, van Riesen C. Short- and long-term dopamine depletion causes enhanced beta oscillations in the cortico-basal ganglia loop of parkinsonian rats. *Exp Neurol.* 2016 Dec;286:124-136.

7. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8. Komplette Publikationsliste

1. **Beck MH**, Haumesser JK, Kühn J, Altschüler J, Kühn AA, van Riesen C. Short- and long-term dopamine depletion causes enhanced beta oscillations in the cortico-basal ganglia loop of parkinsonian rats. *Exp Neurol*. 2016 Dec;286:124-136. (Impact Factor 4,7)

2. Haumesser JK, Kühn J, Güttler C, Nguyen DH, **Beck MH**, Kühn AA, van Riesen C. Acute *in Vivo* Electrophysiological Recordings of Local Field Potentials and Multi-unit Activity from the Hyperdirect Pathway in Anesthetized Rats. *J. Vis. Exp.* (2017; in press) (Impact Factor 1,1)

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei meinem Betreuer und Laborleiter Dr. Christoph van Riesen bedanken, der mein Projekt immer mit freundlichem Rat und hilfreicher Tat unterstützt hat. Auch möchte ich einen großen Dank an meine betreuende Hochschullehrerin Prof. Andrea Kühn für die stete Unterstützung unserer Projekte und meiner Promotion richten. Besonders möchte ich mich bei meinem Freund und Kollegen Jens Haumesser bedanken, der bei der Etablierung unserer Methodik Großes geleistet hat. Ohne ihn würde das Labor nicht in seiner jetzigen Form existieren können. Unserer technischen Assistentin Jennifer Altschüler möchte ich für die Etablierung der neuen Histologie Protokolle danken. Auch möchte ich Johanna Kühn für die fruchtbaren Diskussionen über meine und ihre Datenanalyse danken. Einen Dank möchte ich Dr. Vadim Nikulin für die großzügige Hilfe bei der Auswertung der Elektrophysiologie aussprechen. Danken möchte ich Prof. Martin Nawrot für seine lehrreiche Matlab-Einführung.

Ein großer Dank gilt Prof. Judith Walters und ihrem Labor am NIH für die tatkräftige Unterstützung bei der Etablierung der Analyse der Spike-Triggered Waveform Averages. Danken möchte ich auch besonders Prof. Constance Scharff, ihre tatkräftige Unterstützung bei der Histologie half in schwerer Stunde.

Ohne die großzügige Finanzierung der KFO 247 durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft hätte dieses Projekt nicht realisiert werden können, hierfür möchte ich mich ausdrücklich bedanken.

Auch möchte ich hier meiner Familie und meinen Freunden für ihre stete Unterstützung und Aufmunterung danken. Besonders gilt es hier Martin Kluge zu erwähnen, der mir bei der statistischen Auswertung hilfreich zur Seite stand. Danken möchte ich auch meinem Freund und Mitbewohner Nico Kron, der in arbeitsreichen Zeiten stets die kulinarische Versorgung garantierte.