

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

DISSERTATION

**Regulation der zellulären Plastizität in  
der adulten Substantia nigra: Effekte  
von reizreicher Umgebung und  
physischer Aktivität**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eberhard Siebert  
aus Frankenthal

- Gutachter:
1. Prof. Dr. med. A. Kupsch
  2. Prof. Dr. med. R. Morgenstern
  3. Priv.-Doz. Dr. med. G. Höglinger

Datum der Promotion: 19.09.2008

**Meiner Familie und Anke**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
1.1	Übersicht.....	10
1.2	<b>Das Parkinson Syndrom .....</b>	<b>10</b>
1.2.1	Epidemiologie und Klinik .....	10
1.2.2	Ätiologie und Pathologie.....	11
1.2.3	Anatomie und Physiologie der Basalganglien.....	12
1.2.4	Pathophysiologie.....	14
1.2.5	Therapieprinzipien.....	14
1.3	<b>Plastizität des adulten Gehirns.....</b>	<b>18</b>
1.3.1	Detektion proliferativer Prozesse im ZNS – der Marker BrdU .....	18
1.3.2	Adulte Neurogenese.....	19
1.3.3	Neuropermissivität.....	20
1.3.4	Die Bedeutung von Dopamin für die adulte Neurogenese .....	20
1.3.5	Zelluläre Plastizität in der SN.....	21
1.3.6	Neuronale Stamm- und Vorläuferzellen.....	22
1.4	<b>Das 6-OHDA-Modell und der Marker Tyrosinhydroxylase.....</b>	<b>23</b>
1.5	<b>Das Rotationsmodell nach Ungerstedt.....</b>	<b>24</b>
1.6	<b>Herleitung der Fragestellung und Ziele der Arbeit.....</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>TIERE, MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>26</b>
2.1	<b>Gesetzliche Bestimmungen.....</b>	<b>26</b>
2.2	<b>Experimentelles Design .....</b>	<b>26</b>
2.3	<b>Versuchstiere.....</b>	<b>27</b>
2.4	<b>Haltungsbedingungen .....</b>	<b>27</b>
2.4.1	Einzelhaltung unter Standardbedingungen .....	27
2.4.2	Reizreiche Umgebung.....	28
2.5	<b>Lauftraining .....</b>	<b>29</b>
2.6	<b>Verwendete Substanzen für Operation, Applikation und histologische Aufarbeitung.....</b>	<b>30</b>
2.7	<b>Verwendete Lösungen .....</b>	<b>31</b>
2.8	<b>Stereotaktische Operationen und intrazerebrale Mikroinjektionen .....</b>	<b>32</b>

<b>2.9</b>	<b>BrdU-Applikation .....</b>	<b>33</b>
<b>2.10</b>	<b>Rotationsverhalten .....</b>	<b>33</b>
<b>2.11</b>	<b>Transkardiale Perfusion .....</b>	<b>34</b>
<b>2.12</b>	<b>Fixierung und Aufarbeitung der Gehirne .....</b>	<b>34</b>
<b>2.13</b>	<b>Histologische Aufarbeitung .....</b>	<b>35</b>
2.13.1	Kresylviolett-färbung nach Nissl .....	35
2.13.2	Immunhistochemie .....	36
2.13.3	Immunfluoreszenzmikroskopie .....	38
2.13.4	Aufziehen der Schnitte auf den Objektträger.....	39
<b>2.14</b>	<b>Auswertung und Statistik.....</b>	<b>39</b>
2.14.1	Histologische Kontrolle der Kanülenposition .....	39
2.14.2	Histologische Quantifizierung von TH- immunreaktiven Zellen .....	40
2.14.3	Histologische Quantifizierung von BrdU- positiven Zellen.....	41
2.14.4	Histologische Quantifizierung von mehrfach markierten Zellen .....	42
2.14.5	Statistische Auswertung.....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Auswirkungen von 6-OHDA-Läsion und reizreicher Umgebung mit Lauftraining auf die Anzahl TH-positiver Neurone in der adulten SN .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der Prüfung des amphetamininduzierten Rotationsverhaltens.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3</b>	<b>Auswirkungen von 6-OHDA-Läsion und reizreicher Umgebung mit Lauftraining auf die Zellproliferation der adulten SN.....</b>	<b>48</b>
<b>3.4</b>	<b>Phänotypische Charakterisierung BrdU-positiver Zellen in der adulten SN der Ratte.....</b>	<b>49</b>
3.4.1	NG2 .....	49
3.4.2	GFAP .....	51
3.4.3	Iba-1 .....	52
3.4.4	Weitere Marker.....	54
<b>3.5</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
3.5.1	Welche Auswirkungen hat die 6-OHDA-Läsion auf die nigrale zelluläre Neogenese unter Standardbedingungen?.....	55
3.5.2	Haben reizreiche Umgebung und physische Aktivität einen Einfluss auf die nigrale zelluläre Neogenese der nativen Ratte?.....	55
3.5.3	Haben reizreiche Umgebung und physische Aktivität einen Einfluss auf die nigrale zelluläre Neogenese der 6-OHDA-lädierten Ratte?.....	55
3.5.4	Kommt es unter den experimentellen Bedingungen zur Differenzierung proliferierender Zellen der SN in (dopaminerge) Neurone?.....	55
3.5.5	Haben reizreiche Umgebung und physische Aktivität einen Einfluss auf das motorische	

Verhalten der 6-OHDA-lädierten Ratte? .....	56
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Übersicht.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2 Methodenkritik .....</b>	<b>57</b>
4.2.1 Tiere und Tierhaltung.....	57
4.2.2 Das 6-OHDA-Modell als Tiermodell des PS .....	58
4.2.3 Der Proliferationsnachweis mittels BrdU.....	59
<b>4.3 Bedeutung der in der adulten SN proliferierenden Zellen .....</b>	<b>59</b>
4.3.1 Oligodendrozytäre Vorläuferzellen (OPCs).....	60
4.3.2 BrdU-positive GFAP exprimierende Zellen – Astrozyten mit neuronaler Vorläuferfunktion? .....	61
4.3.3 Mikroglia .....	62
4.3.4 Nicht identifizierte Zellen.....	62
<b>4.4 Die adulte Substantia nigra – eine neurogene Region?.....</b>	<b>63</b>
<b>4.5 Auswirkungen der 6-OHDA-Läsion auf die nigrale zelluläre Neogenese .....</b>	<b>65</b>
4.5.1 Auswirkungen der 6-OHDA-Läsion auf die nigrale Zellproliferation.....	66
4.5.2 Auswirkungen der 6-OHDA-Läsion auf die Differenzierung proliferierender Zellen in der adulten SN.....	67
<b>4.6 Auswirkungen von reizreicher Umgebung und Lauftraining auf die zelluläre Neogenese in der adulten SN .....</b>	<b>69</b>
4.6.1 Auswirkungen von reizreicher Umgebung und Lauftraining auf die Zellproliferation in der adulten SN.....	69
4.6.2 Auswirkungen von reizreicher Umgebung und Lauftraining auf die Zelldifferenzierung in der adulten SN.....	70
<b>4.7 Auswirkungen von reizreicher Umgebung und Lauftraining auf das amphetamininduzierte Rotationsverhalten und die TH Expression der 6-OHDA-lädierten Tiere.....</b>	<b>73</b>
<b>4.8 Klinische Relevanz der Arbeit .....</b>	<b>78</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>80</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>82</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>100</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>101</b>



## Abkürzungsverzeichnis

<b>6-OHDA</b>	6-Hydroxydopamin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AK</b>	Antikörper
<b>ANOVA</b>	analysis of variance
<b>APC</b>	adenomatöse Polyposis coli
<b>BDNF</b>	brain-derived neurotrophic factor
<b>BrdU</b>	5-Bromo-2-desoxyuridin
<b>BROI</b>	interessierende Gehirnregion (brain region of interest)
<b>CNPase</b>	2',3'zyklische-Nukleotid-3'Phosphodiesterase
<b>DA</b>	Dopamin
<b>DAB</b>	3,3 Diaminobenzidindihydrochlorid
<b>DBS</b>	tiefe Hirnstimulation (deep brain stimulation)
<b>DCX</b>	Doublecortin
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>GFAP</b>	saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>PS</b>	Parkinson Syndrom
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>L-Dopa</b>	Levodopa
<b>M</b>	molar
<b>MFB</b>	mediales Vorderhirnbündel (medial forebrain bundle)
<b>MPTP</b>	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
<b>N</b>	normal
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid

<b>NSC</b>	neurale Stammzelle (neural stem cell)
<b>OPC</b>	oligodendrozytäre Vorläuferzelle (oligodendrocyte progenitor cell)
<b>OT</b>	Objekträger
<b>PDGF</b>	platetet-derived growth factor
<b>PSA-NCAM</b>	polysialiertes neuronales Zelladhäsionsmolekül
<b>SNc</b>	Substantia nigra pars compacta
<b>SNr</b>	Substantia nigra pars reticulata
<b>S-Phase</b>	Synthesephase
<b>SVZ</b>	subventrikuläre Zone
<b>TH</b>	Tyrosinhydroxylase
<b>VTA</b>	Area tegmentalis ventralis (ventral tegmental area)
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

# **1 Einleitung**

## **1.1 Übersicht**

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, das Verständnis über das Potenzial der zellulären Plastizität der adulten Substantia nigra (SN) zu erweitern. Ein tieferes Verständnis dieser Plastizität und ihrer Regulationsmechanismen könnte, sowohl im physiologischen, als auch im pathophysiologischen Kontext des Parkinson Syndroms (PS), durch Eröffnung neuer Therapiestrategien klinische Relevanz erlangen. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von reizreicher Umgebung und körperlicher Aktivität in Form von Lauftraining auf dem Laufrad auf die zelluläre Plastizität der adulten SN untersucht. Insbesondere sollte die Frage geklärt werden, ob unter diesen Versuchsbedingungen neuronale Vorläuferzellen generiert werden, die zu dopaminergen Neuronen heranreifen und ob es zu Veränderungen der Proliferation von Zellen mit glialen Markern kommt. Die Untersuchungen wurden sowohl in der nativen Ratte als auch im Tiermodell des PS durchgeführt.

Diese Einleitung wird eine Einführung geben in die Themen, die zum Verständnis der Arbeit nötig sind und dabei die Wissenslücken und aber auch Erkenntnisse aufzeigen, die zur Formulierung der Fragestellungen und Hypothesen sowie den daraus entwickelten Experimenten im Rahmen dieser Arbeit geführt haben.

Dabei wird zunächst eine kursorische Übersicht über verschiedene Aspekte des PS gegeben werden, die im inhaltlichen Zusammenhang mit dieser Arbeit stehen. Ein weiterer wichtiger Abschnitt dieses Kapitels wird sich mit dem gegenwärtigen Stand der Erkenntnis zur Plastizität im adulten ZNS mit Betonung der Substantia nigra beschäftigen. Dabei wird besonderes Gewicht auf die Modulierbarkeit und Regulation plastischer Vorgänge gelegt werden. Im Anschluss daran sollen einige methodische Erklärungen zu Modellen folgen, deren Bedeutung für das Verständnis der Arbeit über eine rein technische Beschreibung im Material und Methoden Kapitel hinausgeht. Die Einleitung schließt mit der Herleitung der für diese Arbeit aufgestellten Hypothesen und zugehörigen Fragestellungen.

## **1.2 Das Parkinson Syndrom**

### **1.2.1 Epidemiologie und Klinik**

Das Parkinson Syndrom (PS) ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Die Prävalenz liegt bei über 1% der über 60-Jährigen und nimmt mit steigendem Alter zu (Bennett et al., 1996). Aufgrund dieser epidemiologischen Daten wird die Anzahl der Parkinsonpatienten in Deutschland auf etwa 300.000 geschätzt bei etwa 13.000 Neuerkrankungen jährlich. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen dem 40. und 70.

Lebensjahr (Kupsch & Anneke, 2001). Die Progredienz der Erkrankung folgt keinem linearen Verlauf und ist in den ersten Jahren am höchsten (Lee et al., 1994; Schrag et al., 2007).

Diagnosekriterien gemäß der Parkinson's Disease Society Brain Bank, London sind das Vorliegen von zwei der drei Kardinalsymptome Ruhetremor, Bradykinese und Rigor (Hughes et al., 1992 & 1993). Weitere, die Diagnose PS stützende Faktoren sind unter anderem asymmetrischer Beginn sowie klinische Besserung auf L-Dopa (Hughes et al., 1992; Ward & Gibb, 1990). Darüber hinaus können Hypomimie, Mikrographie, posturale Instabilität und Dysarthrophonie vorliegen. Ferner werden Symptome der autonomen Dysregulation beobachtet wie Seborrhoe, Sialorrhoe, Dyshidrose, Obstipation sowie Potenz- und Kontinenzstörungen. Zu den psychiatrischen Symptomen, die bei bis zu 70% der Patienten zu beobachten sind, gehören Depressionen, Angststörungen, Denkverlangsamung, Demenz und kognitive Störungen (Aarsland et al., 1999; Brown & MacCarthy, 1990; Cummings, 1992).

Die klinische Einteilung des PS erfolgt simplifiziert nach Hoehn und Yahr in fünf Stadien oder nach UPDRS (Unified Parkinson Disease Rating Score) und korreliert mit der Progredienz der Erkrankung, die wiederum vom Ausmaß der dopaminergen Degeneration bestimmt wird (Fearnley & Lees, 1991; Hoehn & Yahr, 1967). Parkinson-Syndrome können unterschieden werden in das idiopathische PS, also den M. Parkinson im engeren Sinne, symptomatische Formen sowie atypische Formen. Zu letzteren gehören verschiedene Formen der Systemdegeneration. Symptomatische Formen können posttraumatisch, postinfektiös, neoplastisch, medikamenteninduziert, zerebrovaskulär oder toxisch bedingt sein.

### **1.2.2 Ätiologie und Pathologie**

Das PS gehört zur Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen und ist charakterisiert durch einen kontinuierlichen Verlust neuromelaninhaltiger dopaminergener Neurone in der SNc. Dies hat die Depigmentierung dieser Region zur Folge. Beide Phänomene sind nicht spezifisch für das PS aber notwendig für die neuropathologische Diagnose. Ferner sind nach dem zu Beginn des 20. Jahrhunderts an der Charité tätigen Erstbeschreiber Friedrich H. Lewy benannte, intraneuronale, eosinophile Einschlusskörperchen nachweisbar, die aus  $\alpha$ -Synuclein, Synphilin-1 und Ubiquitin bestehen (Forno, 1996; Lewy, 1912). Neurodegenerative Veränderungen sind auch in extranigralen Gebieten nachweisbar (Braak et al., 2000). Die Ursachen und Mechanismen des progressiven Untergangs der dopaminergener Neurone in der SNc im Rahmen des PS sind noch immer unbekannt und es werden eine Vielzahl von Theorien diskutiert, wie die Störung der mitochondrialen Funktion, die Störung des Eisenstoffwechsels, die Wirkung von oxidativem Stress und freien Radikalen sowie Umweltfaktoren (Olanow & Tatton, 1999;

Ramsden et al., 2001; Tanner & Langston, 1990). Neben dem sporadischen PS sind familiäre Parkinson Syndrome bekannt, die ursächlich bedingt sind durch genetische Defekte, unter anderem im  $\alpha$ -Synuclein-Gen, Parkin-Gen, Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1-Gen und im DJ1-Gen (Barzilai & Melamed, 2003).

Stereologischen Untersuchungen zufolge wird die Gesamtzahl der dopaminergen Neurone in der SNc junger Erwachsener auf 550.000 geschätzt (Pakkenberg et al., 1991). Pro Lebensdekade ist eine geschätzte alterungsbedingte Abnahme von etwa 5% zu verzeichnen (Fearnley & Lees, 1991). Beim normalen Alterungsprozess wird jedoch die kritische Schwelle zum Auftreten von Symptomen des PS nicht erreicht. Eine klinische Manifestation des PS ist zu beobachten nach Verlust von mindestens 50% der nigralen dopaminergen Neurone und etwa 70% bis 80% Abnahme des striatalen Dopamingehalts (Bernheimer et al., 1973). Über die Art des Zelltodes wird noch diskutiert. Es liegen sowohl Ergebnisse vor, die für Apoptose sprechen als auch solche, die dagegen sprechen (Barzilai & Melamed, 2003).

### **1.2.3 Anatomie und Physiologie der Basalganglien**

Das Wissen um die Funktion der Basalganglien ist Voraussetzung zum Verständnis der Pathophysiologie des PS und bildet den theoretischen Hintergrund zu den hier durchgeführten Experimenten. Als Basalganglien wird eine Gruppe von subkortikalen, funktionell zusammengehörigen Hirnkernen bezeichnet, die entscheidend an der Kontrolle motorischer Prozesse beteiligt sind. Im engeren Sinne werden beim Menschen die telencephalen subkortikalen Kerne Corpus striatum, bestehend aus Ncl. caudatus und Putamen, sowie Globus pallidus mit seiner Pars externa (GPe) und interna (GPi) zu den Basalganglien gerechnet. Funktionell sind jedoch auch der diencephale Ncl. subthalamicus (STN) und die mesencephale SN mit ihren beiden Anteilen, der Pars compacta und Pars reticulata den Basalganglien zugehörig. Ein im limbischen System generierter und in Assoziationskortex modifizierter Bewegungsimpuls wird an Basalganglien und Cerebellum weitergeleitet. In Letzterem erfolgt die Korrektur und Feinabstimmung, in den Basalganglien die Bahnung oder Unterdrückung der Bewegungsentwürfe. Die neuronalen Informationsschleifen konvergieren in den Nuclei ventrales des motorischen Thalamus, die das Ergebnis der Integration an den Motokortex leiten. Vereinfachend modellhaft kann der motorische Informationsfluss der Basalganglien in zwei Wege, als direkt und indirekt bezeichnet, unterschieden werden (Alexander & Crutcher, 1990; Nakano, 2000; Smith et al., 1998).

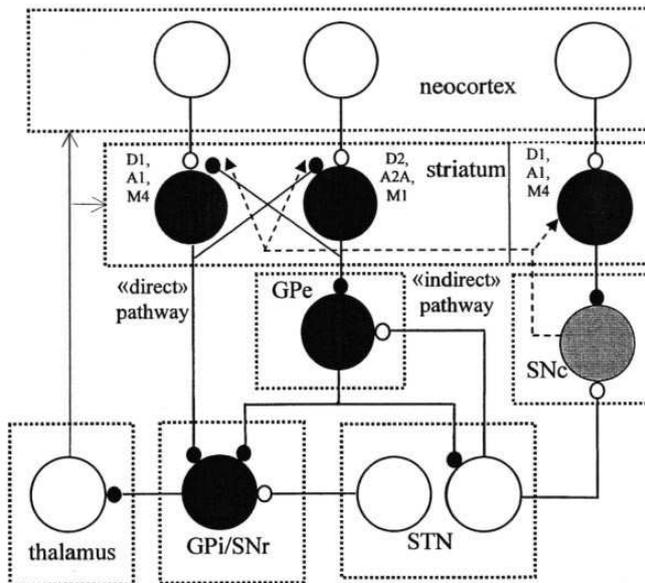


Abb. 1 Vereinfachte schematische Darstellung neuronaler Schaltkreise der Basalganglien (aus Silkis, 2001; Seite 8).

Die Input-Region der Basalganglien ist das Striatum, welches glutamaterge, exzitatorische, kortikale Afferenzen erhält. Striatum befinden sich neben cholinergen inhibitorischen Interneuronen zwei GABA-erge Projektionssysteme, die unterschiedliche Ko-Transmitter besitzen. Die Axone der GABA-ergen Projektionsneurone des direkten Weges, die durch ihre Ko-Transmitter Substanz P und Dynorphin gekennzeichnet sind, ziehen monosynaptisch zum GPi und zur SNr, den Output-Regionen der Basalganglien, die ihrerseits inhibitorisch GABA-erg auf den motorischen Thalamus projizieren. Durch die Hemmung der Hemmung resultiert daher im direkten Weg die Disinhibition, also Aktivierung thalamischer Kerne. Von dort aus schließt sich die neuronale Informationsschleife mit einer glutamatergen Projektion zurück in kortikale Areale. Die Projektionsneurone des indirekten Weges, deren Ko-Transmitter Enkephalin ist, senden ihre Axone polysynaptisch über den GABA-ergen GPe zum STN. Dabei ist der STN die einzige Station der Basalganglien, die mit Glutamat einen exzitatorischen Transmitter aufweist und damit gewissermaßen den Motor dieses neuronalen Netzwerkes darstellt (Do & Bean, 2003; Hammond et al., 1987). Die Efferenzen des NST aktivieren ihrerseits die GABA-ergen Neurone von GPi und SNr und schließen somit die indirekte Basalganglienschleife, an deren Ende über die STN induzierte Aktivierung von GPi und SNr eine verstärkte Inhibition des motorischen Thalamus und letztlich kortikaler Areale resultiert. Zusammenfassend fördert der direkte Weg den motorischen Informationsfluss, der indirekte hemmt ihn.

Dopaminerge Neurone der SNc, die über das MFB in das Striatum projizieren, modulieren die Aktivität der striatalen Projektionsneurone in der Form, dass die Neurone

des direkten, die Motorik fördernden Weges durch Dopamin über ihre D1-Rezeptoren aktiviert werden, während die Neurone des indirekten, die Motorik hemmenden Weges durch Dopamin über ihre D2-Rezeptoren inhibiert werden. Somit führt Dopamin letztlich zur Aktivierung der exzitatorischen thalamokortikalen Projektionen.

#### **1.2.4 Pathophysiologie**

Als Folge der Degeneration der nigralen Neurone der SN entsteht ein Mangel an striatalem Dopamin (Ehringer & Hornykiewicz, 1960). Das hat eine Überaktivierung striataler cholinergischer Interneurone zur Folge sowie einen vermehrten Informationsfluss über den indirekten, die Motorik hemmenden Weg, da die inhibitorische D2-Rezeptor vermittelte Wirkung des Dopamins auf den indirekten Weg wegfällt und die aktivierende D1-Rezeptor vermittelte Wirkung des Dopamins im direkten Weg reduziert ist (Wichmann & DeLong, 1996). Die Folge der Überaktivierung des indirekten Weges ist die verstärkte Hemmung des GPe, der seinerseits den STN dadurch weniger inhibieren kann. Es resultiert eine Überaktivität von STN und konsekutiv von SNr, GPi, den inhibitorischen Ausgangsstrukturen der Basalganglien (Bergman et al., 1994; Fillion & Tremblay, 1991; Mitchell et al., 1989). Diese hemmen nun verstärkt den motorischen Thalamus, der den Motokortex dadurch vermindert aktivieren kann (Wichmann & DeLong, 1999). Mittels dieses vereinfachenden Modells sind insbesondere die motorischen Minussymptome Bradykinese oder Akinese erklärbar. Ferner wird diskutiert, ob die Überaktivität des STN und die damit verbundene verstärkte, exzitotoxisch wirkende, glutamaterge Transmission den Zelluntergang in der SN verstärkt oder zumindest unterhält (Blandini et al., 1996; Chergui et al., 1994; Kühn et al., 2006; Paul et al., 2004; Sonsalla et al., 1989 & 1991; Zeevalk et al., 2000).

#### **1.2.5 Therapieprinzipien**

Da es sich beim PS um eine chronisch-progrediente, neurodegenerative Erkrankung ungeklärter Ätiologie handelt, ist zurzeit weder eine kurative noch eine präventive Therapie sondern lediglich eine symptomatische Behandlung verfügbar. Die Therapiestrategie besteht aus einer Kombination von medikamentöser Therapie, operativer Therapie, Physiotherapie, Ergotherapie, Logopädie und psychosozialer Betreuung.

##### *1.2.5.1 Medikamentöse Therapie*

Die Rationale der Pharmakotherapie des PS ist die bestmögliche Wiederherstellung der normalen Transmitter- und damit Erregungsverhältnisse. Basis dieser Therapie ist der Ersatz von Dopamin, entweder durch die Vorläufersubstanz L-Dopa oder über

Dopaminrezeptoragonisten. Auch mittels Monoamino-Oxidase-B (MAO-B)- Inhibitoren, Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT)- Inhibitoren, Glutamatrezeptor (NMDAR)-Antagonisten und Anticholinergika, den wichtigsten weiteren Substanzklassen, kann, entsprechend den oben skizzierten physiologischen und pathophysiologischen Überlegungen, regulierend in das Ungleichgewicht der Transmitter eingegriffen werden. Allen Substanzklassen ist gemein, dass sie in der Anfangsphase der Erkrankung manchmal eine Symptombefreiheit bewirken können. Bereits nach etwa fünfjähriger Therapie kommt es jedoch durch den fortschreitenden Untergang der dopaminergen Neurone und deren Dopaminrezeptoren zu Wirkungslimitationen, die sich in starken Wirkungsfluktuationen (on-off-Phänomen), Peak-of-dose-Dyskinesien, End-of-dose-Akinesien sowie psychiatrischen Syndromen bis hin zum kompletten Wirkungsverlust äußern (Bravi et al., 1994; Poewe et al., 1986). Für einzelne Substanzklassen, wie dem L-Dopa z.B. wird zudem diskutiert, ob die symptomatische Therapie selbst neurotoxisch ist (Fahn, 1996 & 2004).

Dem entgegengesetzt wird für eine Reihe von Substanzen angenommen, dass sie neuroprotektiv wirken. Als neuroprotektive Therapien wurden solche Therapiestrategien definiert, die in der Lage sind, andauernde Benefits zu bewirken, indem sie die der neurodegenerativen Erkrankung zugrunde liegende Ätiologie oder Pathogenese beeinflussen, der Erkrankung vorbeugen oder den Ausbruch oder die Progression der Erkrankung verzögern (Ravina et al., 2003; Shoulson, 1998). Für eine Vielzahl von Substanzen weisen Studien auf neuroprotektive Wirksamkeit in Tiermodellen des PS hin. Bis jetzt konnte jedoch für keine der in klinischen Studien getesteten Substanzen ein eindeutiger neuroprotektiver Effekt überzeugend demonstriert werden. Daher wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert, ob beispielsweise Dopaminagonisten, NMDA-Rezeptoragonisten, Coenzym Q und zuletzt insbesondere MAO-B- Inhibitoren, wie etwa Selegilin (DATATOP-Studie) neuroprotektiv wirksam sind (Hauser & Zesiewicz, 2006; Olanow et al., 1998; Poewe, 2006; Storch et al., 2007).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die heutige Therapie mit schweren, die Lebensqualität deutlich einschränkenden und schlecht behandelbaren Nebenwirkungen behaftet ist und letztlich nicht in der Lage ist, die Mortalität zu reduzieren und das Vorschreiten der nigralen Degeneration aufzuhalten (Hely et al., 2005).

Die Entwicklung neuer Therapiestrategien, die semikausal korrigierend in das gestörte Gleichgewicht neuronaler Aktivität der Basalganglien eingreifen oder kausal ansetzen und den neuronalen Zelltod verlangsamen oder aufhalten, ist ebenso unverzichtbar wie die Entwicklung restaurativer Verfahren zum Ersatz degenerierter Areale.

#### *1.2.5.2 Tiefe Hirnstimulation*

Die tiefe Hirnstimulation (DBS) ist ein reversibles Verfahren, das in den pathologisch

veränderten Signalfloss der Basalganglien beim PS eingreift und damit das Gleichgewicht neuronaler Erregungsvorgänge wiederherstellt (Garcia et al., 2005; Meissner et al., 2007). Für die Therapie des PS stehen die Hochfrequenzstimulation (HFS) des Nucleus ventralis intermedius des Thalamus (VIM), des GPi und des STN zur Verfügung (Anderson et al., 2005; Benabid et al., 1996; Blond et al., 1992; Volkmann et al., 2001). Der Wirkmechanismus ist weitgehend ungeklärt und wahrscheinlich abhängig vom stimulierten Areal und den dortigen neuronalen Strukturen sowie von den Stimulationsparametern. Die Nettowirkung entspricht jedoch einer funktionellen Inhibition und ist in dieser Hinsicht der strukturellen Läsion identisch (Dostrovsky & Lozano, 2002).

Entsprechend den gängigen pathophysiologischen Vorstellungen zum PS mit gestörtem Signalfloss in den Basalganglien und Überaktivität des STN, lassen tierexperimentelle Daten vermuten, dass die funktionelle Inhibition dieses Kernes möglicherweise via Reduktion der glutamatergen Transmission zu einer verminderten Exzitotoxizität in der SN führt (Aziz et al., 1991 & 1992; Bergmann et al., 1990; Bergmann et al., 2004; Carvallho & Nikkhah, 2001; Guridi et al., 1996; Meissner et al., 2002; Nakao et al., 1999; Paul et al., 2004; Piallat et al., 1996 & 1998; Winter et al., 2006). Im Gegensatz zu diesen tierexperimentellen Arbeiten ist jedoch zu erwähnen, dass über eine Progressionsverlangsamung in tiefenhirnstimulierten Parkinson-Patienten noch kontrovers diskutiert wird (Hilker et al., 2005; Piallat et al., 1999).

#### *1.2.5.3 Neurotransplantation und andere reparative Strategien*

Die Neurotransplantation stellt ein restauratives Therapieverfahren dar, das semikausal in das Krankheitsgeschehen eingreifen und die degenerierten nigralen Neurone durch dopaminproduzierendes Gewebe ersetzen soll. Neben der autologen Transplantation von Gewebe des Nebennierenmarkes wird auch die heterologe Transplantation von embryonalem Mittelhirngewebe durchgeführt sowie in letzter Zeit verstärkt die Transplantation von Stammzellen. Es konnte gezeigt werden, dass transplantierte Zellen im Striatum überleben, dort Dopamin produzieren und Funktionsdefizite im Tiermodell des MP beheben können (Hauser et al., 1999; Kim et al., 2002; Kupsch et al., 1991; Lindvall et al., 1990; Madrazo et al., 1988). Jedoch sind alle Ansätze mit starken Nebenwirkungen behaftet und es konnte bis jetzt für keine Methode eine Steigerung der Lebensqualität oder eine Prognoseverbesserung nachgewiesen werden (Freed et al., 2001; Goetz et al., 1991; Olanow et al., 2003; Winkler et al., 2005). Die bestenfalls teilweise Verbesserung der PS-Symptomatik wird damit begründet, dass die Dopaminproduktion und Freisetzung des transplantierten Gewebes nicht in orthotoper Lokalisation erfolgt und auch nicht durch die physiologischen Mechanismen reguliert wird. So treten bei bis zu 50% der Patienten starke off-drug Dyskinesien auf (Freed et al., 2001; Hagell et al.,

2002; Olanow et al., 2003). Weitere limitierende Faktoren sind immunologische Probleme und niedrige Überlebensraten der transplantierten Zellen (Olanow et al., 2003; Winkler et al., 2005) sowie ethische Bedenken.

Jüngste neuroreparative Strategien haben zum Ziel, das physiologische, plastische Potenzial des Gehirns auszunutzen und durch die Induktion von Neurogenese den Verlust von Neuronen zu kompensieren. Dadurch ließen sich ethische und logistische Limitationen umgehen, was Verfügbarkeit und Verbrauch von Embryonen angeht, als auch Operationsrisiken, –kosten und immunologische Probleme. Zudem kämen solche Strategien der normalen Physiologie deutlich näher als die Transplantation und entsprächen dem Ideal der kausalen Therapie deutlich besser.

#### *1.2.5.4 Physiotherapie*

Bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen im Allgemeinen und PS im Speziellen können physische Aktivität und die Erfahrung des Neuen zu einer Verbesserung motorischer und kognitiver Funktionen führen. Eine Vielzahl klinischer Studien und Beobachtungen bei PS Patienten berichtet von Benefits adjuvanter Physiotherapie, die in ein umfassendes Therapieregime eingebunden ist. Es konnte gezeigt werden, dass Physiotherapie und körperliche Aktivität zu einer Verbesserung der motorischen Funktion führen und die Lebenserwartung nach Beginn der Physiotherapie erhöhen (Bilowit, 1965; Franklyn et al., 1981; Hurwitz, 1989; Knott, 1957; Palmer, 1986; Szekely et al., 1982; Toole et al., 2000). Ferner wird diskutiert, ob sich physische Aktivität in jungen Jahren protektiv auf die Entwicklung des PS auswirkt (Chen et al., 2005; Sasco, 1992).

In tierexperimentellen Arbeiten mit Modellen des PS konnte gezeigt werden, dass Tretmühlenlaufen als Form physischer Aktivität bei 6-OHDA-lädierten Ratten zur Kompensation von motorischen Defiziten führt einhergehend mit Abschwächung neurochemischer Defizite (Tillerson et al., 2001 & 2002 & 2003). Es wurde in diesen Studien gezeigt, dass körperliche Aktivität die post lesionem auftretende Reduktion der striatalen Konzentration von Dopamin und seinen Metaboliten, der Expression von Dopamintransportern sowie der striatalen TH-Expression abschwächt. Weiter wird diskutiert, ob körperliche Aktivität eine Plastizitätsinduktion im nigrostriatalen System bewirken kann, über die die motorischen Verbesserungen erklärbar sein könnten. In verschiedenen Tiermodellen zu ZNS-Verletzungen wurde nachgewiesen, dass körperliche Aktivität zu gesteigerter Neurogenese im Hippocampus führt (Taupin, 2006; Van Praag et al., 1999), ferner zu Langzeitpotenzierung (Van Praag et al., 1999), Gliazellproliferation (Bury et al., 2000), Veränderungen der Spiegel von Neurotransmittern und Metaboliten (Bland et al., 1999), Veränderung der Expression von Transkriptionsfaktoren (Kleim et al., 1996; Liste et al., 1997), Verstärkung der Expression neurotropher Faktoren (Gomez-

Pinilla et al., 1998; Neeper et al., 1995) und Wachstumsinduktion von neuronalen Fortsätzen (Jones & Schallert, 1994).

### **1.3 Plastizität des adulten Gehirns**

Während das adulte Gehirn zum Großteil bis in die frühen neunziger Jahre hinein als eine statische Struktur angesehen wurde, ist dieses Konzept heute zugunsten einer in großem Umfang möglichen Plastizität unterschiedlicher Ausprägung ersetzt worden. Unter Plastizität im adulten Gehirn versteht man dabei im Allgemeinen die Fähigkeit von einzelnen Nervenzellen oder auch ganzen Hirnarealen, sich in ihren Eigenschaften zeitlebens zu verändern (Kolb & Whishaw, 1998). Diese Veränderungen werden über komplexe Mechanismen reguliert und sind vielfältig modulierbar. Plastizität des Gehirnes umfasst dabei die Veränderung sehr unterschiedlicher Vorgänge, sowohl funktioneller Natur, wie der synaptischen Transmission, im Sinne von Langzeitpotenzierung und –depression (Cooke & Bliss, 2006), als auch struktureller Natur, wie das Auswachsen von Axonen und Dendriten, Spines und Synapsen (Harms & Dunaevsky, 2006) sowie die Neubildung von Gliazellen und Neuronen, auch als Gliogenese bzw. Neurogenese bezeichnet (Gould & Gross, 2002; Rosenzweig et al., 1962).

#### **1.3.1 Detektion proliferativer Prozesse im ZNS – der Marker BrdU**

Der Proliferationsmarker 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU) wird, neben seiner Verwendung in der Tumordiagnostik, eingesetzt zur indirekten Detektion von Stamm- und Vorläuferzellen. Eine direkte Detektion ist zur Zeit noch nicht möglich, da keine spezifischen Markerproteine bekannt sind, die eine eindeutige Zuordnung von Stamm- und Vorläuferzellen zu bestimmten Stadien der Stammzellsystematik ermöglichen würden. Durch Kolo-kalisation mit den anderen Markern wird eine Aussage über die phänotypische Differenzierung der BrdU- markierten Zelle möglich. BrdU ist ein Analogon der Base Thymidin, einer der vier Basen der DNA. Es konkurriert bei systemischer Applikation mit dieser Base und wird, wenn im Überfluss vorhanden, während der S-Phase sich teilender Zellen im Zuge der Verdoppelung der DNA in den neu synthetisierten Strang inkorporiert. Somit können mittels der BrdU-Immunreaktion proliferierende Zellen selektiv visualisiert werden. Ist BrdU für die gesamte Dauer der S-Phase vorhanden, wird jede sich teilende Zelle markiert. Da BrdU in bioaktiver Form jedoch lediglich 30 Minuten bis 2 Stunden in Geweben nachweisbar ist, wird nur ein Teil aller sich teilenden Zellen markiert. Erst mit wiederholten Applikationen, deren Abstand kürzer sein muss als die Dauer einer S-Phase, können kumulativ alle sich teilenden Zellen markiert werden. Zur Untersuchung des Differenzierungspotentials proliferierender Zellen wird BrdU daher über einen Zeitraum von mehreren Tagen einmal täglich appliziert (Kempermann et al., 1997).

### 1.3.2 Adulte Neurogenese

Von zwei Regionen des ZNS ist bekannt, dass dort kontinuierlich unter physiologischen Bedingungen neue Neurone generiert werden. Das sind die subventrikuläre Zone des Seitenventrikels, in der unter anderem die sich ständig regenerierenden Neurone des Bulbus olfactorius gebildet werden, und die subgranuläre Zone des Gyrus dentatus in der Hippocampusformation (Altman & Das, 1965; Eriksson et al., 1998; Kornack & Rakic, 2001; Lois & Alvarez-Buylla, 1993). Im Hippocampus wandert ein Teil der Nachkommen dieser teilungsaktiven Zellen der subgranulären Zone in die Körnerschicht ein und differenziert sich zu Neuronen, die in funktionelle neuronale Netzwerke integriert werden (Hastings et al., 1999; Jessberger & Kempermann, 2003; Markakis & Gage, 1999; Van Praag et al., 2002). Ein Großteil der Zellen wird jedoch eliminiert, sodass lediglich die Anzahl wirklich benötigter Zellen rekrutiert wird (Biebl et al., 2000).

Für den Hippocampus konnte gezeigt werden, dass diese proliferative Aktivität und Rekrutierung aktivitätsabhängig erfolgen, denn physiologische Stimuli wie körperliche Aktivität, beispielsweise Lauftraining, und auch Leben in einer reizreichen Umgebung (enriched environment) stimulieren sowohl Neurogenese als auch Gliogenese (Kempermann et al., 1997; Kim et al., 2002; Steiner et al., 2004; Van Praag et al., 1999). Weiterhin werden Neurogenese und Gliogenese moduliert durch spezifisch-funktionelle Stimuli wie Lernen und die Erfahrung von Komplexität, physiologische Stimuli wie endokrine und parakrine Faktoren (Hormone und Wachstumsfaktoren) sowie pathologische Faktoren wie Stress, zerebrale Traumata und Noxen (Gould und Gross, 2002, Kempermann, 2004). So konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass pharmakologisch induzierte epileptische Anfälle, chemisch induzierte Demyelinisierungen oder Entzündungsprozesse, Nervenfaserschnittstellen und ischämische Insulte die proliferative Aktivität in der subventrikulären Zone und im Hippocampus erhöhen, und dass die neugebildeten Vorläuferzellen in die geschädigten Areale migrieren und dort gliale und neuronale Differenzierungsprozesse induzieren (Calza et al., 1998; Gould et al., 1997; Holmin et al., 1997; Nait-Oumesmar et al., 1999; Szele & Chesselet, 1996; Taupin, 2006; Weinstein et al., 1996). Ferner wurde gezeigt, dass nach striataler 6-OHDA-Läsion der SN und Applikation von TGF $\alpha$  Präkursorzellen aus der subventrikulären Zone in das Striatum migrieren und sich dort zu Neuronen differenzieren, die in funktionellen Abläufe integriert werden (Fallon et al., 2000). Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter sind damit ebenfalls involviert in die Regulation neurogener Prozesse (Cameron et al., 1998). Die genauen zellulären und molekularen Mechanismen, über welche die kursorisch aufgezählten Stimuli die Neurogenese regulieren und modulieren, sind jedoch zum größten Teil unbekannt (Hagg, 2005).

### **1.3.3 Neuropermissivität**

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sich multipotente Vorläuferzellen, die die Fähigkeit zur Generierung von Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten besitzen, aus wahrscheinlich allen Arealen des ZNS isolieren lassen (Kondo & Raff, 2000; Palmer et al., 1999). Dennoch ist adulte Neurogenese auf einige wenige Areale des Gehirns beschränkt. Diese Diskrepanz weist darauf hin, dass die Präsenz von neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen lediglich eine notwendige aber keine hinreichende Bedingung für die Neurogenität einer Hirnregion darstellt. Multipotente Stammzellen und Vorläuferzellen besitzen also prinzipiell das Potential zur neuronalen Ausdifferenzierung, sind aber von Signalen aus der lokalen Mikroumgebung abhängig. Es konnte vielfach im Rahmen experimenteller Transplantationsstudien gezeigt werden, dass die Differenzierung von Stamm- und Vorläuferzellen abhängig ist von dem Areal, in welches sie transplantiert werden (Lie et al., 2002; Shihabuddin et al., 2000). So wurde beispielsweise von diesen Autoren gezeigt, dass sich multipotente Vorläuferzellen aus Rückenmark oder SN in orthotoper Lokalisation lediglich zu gliazellen differenzieren, während sie in heterotoper Lokalisation im Hippocampus Neurone generieren. Diese Experimente stützen das Konzept der Ortsspezifität, das besagt, dass lokale Faktoren der Mikroumgebung entscheidend das Ausmaß der Plastizität bestimmen. Daher stellt sich die Frage, welche zellulären und molekularen Faktoren bzw. Mechanismen die Neurogenität einer Hirnregion bedingen. Die Antworten darauf sind noch zum Großteil unbekannt.

### **1.3.4 Die Bedeutung von Dopamin für die adulte Neurogenese**

Während der Entwicklung des Säugerhirnes spielt Dopamin eine wichtige Rolle bei der Morphogenese durch Regulierung der proliferativen Aktivität neuraler Stammzellen in den embryonalen Keimzonen (Cameron et al., 1998; Diaz et al., 1997; Lidow et al., 1995; Ohtani et al., 2003). So sind bereits während der frühen Ontogenese Dopamin und seine Rezeptoren nachweisbar (Diaz et al., 1997; Lidow et al., 1995).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde der Einfluss des Dopamins auf die Generierung neuer Neurone im Hippocampus dargestellt (Höglinger et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die neurogene subventrikuläre Zone als auch die neurogene subgranuläre Zone des hippocampalen Gyrus dentatus dopaminerg innerviert werden (Freundlieb et al., 2006; Höglinger et al., 2004). Dopamindepletion im MPTP-Modell des PS führte in dieser Studie zu einer signifikanten Reduktion der Neurogenese im Hippocampus, im Bulbus olfactorius und in der SVZ, was impliziert, dass Dopaminverlust auch eine Schlüsselrolle für Parkinson-assoziierte, klinisch L-dopa-insensitive Symptome wie Demenz und Anosmie spielen könnte. Ferner wurde gezeigt, dass Dopamin über die Aktivierung D2-ähnlicher-Rezeptoren (D2, D3, D4-R) zur

Erhöhung der proliferativen Aktivität in der SVZ in vivo sowie in Neurosphenen in vitro führte (Gingrich & Caron, 1993; Missale et al., 1998).

Des Weiteren wurde kürzlich auf die Bedeutung von Dopamin und Dopaminrezeptoren für neurale Stammzellen (NSC) im Vorderhirn hingewiesen (Kippin et al., 2005). Hier wurde gezeigt, dass Dopamin in die Generierung und Reifung neuer Zellen auch außerhalb von als neurogen angesehenen Zonen involviert ist. Die Applikation des D2-Rezeptor-antagonistisch wirkenden Haloperidols verstärkte die Proliferation von subependymalen NSCs, während Dopamin den gegenteiligen Effekt zeigte. Andere Studien zeigten eine Steigerung proliferativer Aktivität und Neurogenese in der SVZ und der SN nach Applikation von D3R-Agonisten (van Kampen et al., 2004 & 2005).

Nach 6-OHDA- oder MPTP- vermittelter Dopamindepletion wurde eine Proliferationsverminderung in der subependymalen Zone registriert (Baker et al., 2004; Freundlieb et al., 2006; Höglinger et al., 2004), während in Striatum und SN eine Erhöhung der Gliogenese registriert wurde (Kay & Blum, 2000). Post lesionem war die dopaminerge Neurogenese im Bulbus olfactorius erhöht (Yamada et al., 2004).

Andere Studien zeigten, dass sich die Spiegel verschiedener neurotropher Faktoren post 6-OHDA- oder MPTP-lesionem verändern, was geeignet sein könnte, die Auswirkungen der Dopamindepletion auf neurale Stamm- und Vorläuferzellen zu erklären (Chadi et al., 1994; Nagatsu et al., 2000; Yurek & Fletcher-Turner, 2001).

Zusammenfassend ist aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse dieser Studien davon auszugehen, dass Dopamin, seine Antagonisten, Metaboliten und Rezeptoren die zelluläre Plastizität abhängig von der jeweiligen Region des ZNS, dem Stadium der Zellreife, der Dosierung und den experimentellen Variablen in unterschiedlicher Weise beeinflussen, wobei unser heutiges Verständnis von der Bedeutung von Dopamin für die Plastizität des adulten ZNS als unzureichend zu bewerten ist. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Frage, ob es unter Dopamindepletion im 6-OHDA-Modell zu einer Veränderung der zellulären nigralen Plastizität unter Kontrollbedingungen sowie nach Stimulation durch reizreiche Umgebung und Lauftraining kommt.

### **1.3.5 Zelluläre Plastizität in der SN**

Die Fragen der Neurogenität und Neuropermissivität der adulten SN und damit die Frage, ob in der adulten SN dopaminerge Neurone neu gebildet werden, wird noch kontrovers diskutiert (Chen et al., 2005; Cooper et al., 2004; Frielingsdorf et al., 2004; Kay & Blum, 2000; Lie et al., 2002; Yoshimi et al., 2005; Zhao et al., 2003) ebenso wie die Frage, ob diese Neurogenese in Tiermodellen des PS degenerierte dopaminerge Neurone ersetzen kann. So wurde von einigen Arbeitsgruppen berichtet, dass in der adulten SN der Maus neugebildete Neurone detektiert wurden, deren Neubildung durch MPTP-Läsion des dopaminergen Systems stimuliert wird. Es wurden von denselben Autoren ferner

Daten präsentiert, die für die Neubildung von dopaminergen Neuronen in der adulten SN sprechen (Shan et al., 2006; Zhao et al., 2003). Die Daten anderer Arbeitsgruppen zeigen jedoch keine Hinweise auf das Vorliegen von adulter Neurogenese in der SN, weder bei nativen Mäusen noch nach 6-OHDA-Läsion oder intrastriateller Infusion von GDNF (Chen et al., 2005; Cooper et al., 2004; Frielingsdorf et al., 2004; Lie et al., 2002). Mögliche Erklärungsansätze für diese diskrepanten Befunde sollen in der Diskussion in Zusammenschau mit den eigenen Ergebnissen erörtert werden.

Als gesichert gilt jedoch, dass in der adulten SN kontinuierlich neue neurale Zellen gebildet werden, die unreife gliale Marker und reife oligodendrozytäre, astrozytäre und mikrogliale Marker exprimieren (Dawson et al., 2000; Lie et al., 2002). So wurde gezeigt, dass Subpopulationen dieser Vorläuferzellen, welche das Chondroitinsulfat-Proteoglykan NG2 exprimieren, *in vitro* Neurone generieren können (Lie et al., 2002). Diese Zellen sind in der Lage, nach Transplantation in den Hippocampus Neurone zu generieren. Nach Rücktransplantation in die SN entwickeln sich jedoch keine Neurone sondern lediglich gliäre Zellen (Lie et al., 2002). Von derselben Arbeitsgruppe wurde ebenfalls gezeigt, dass die Mehrzahl der neugebildeten Zellen in der adulten 6-OHDA-lädierten SN das Chondroitinsulfat-Proteoglykan NG2 exprimiert. Des Weiteren konnten unter den proliferierenden Zellen neugebildete Astrozyten gefunden werden, die GFAP exprimieren.

### **1.3.6 Neuronale Stamm- und Vorläuferzellen**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Marker saures Gliafaserprotein (GFAP) und das Chondroitinsulfat-Proteoglykan NG2 auf Kollokalisierung mit dem Proliferationsmarker BrdU untersucht. Des Weiteren wurde die Expression des mikroglialen Markers ionisiertes Kalzium bindendes Adapterprotein 1 (Iba-1) (Imai et al., 1996) des oligodendrozytären Markers 2',3'-zyklische-Nukleotid-3'-Phosphodiesterase (CNPase) (Nishizawa et al., 1985), des immaturren neuronalen Markers Doublecortin (DCX) (Brown et al., 2003) und der postmitotisch neuronalen Marker neuronales nukleäres Protein (NeuN) (Mullen et al., 1992) und Tyrosinhydroxylase (TH) untersucht (Nagatsu et al., 1964). Auf diese Weise wurde untersucht, ob es unter den angewandten Versuchsbedingungen zu einer Proliferation und Differenzierung von Zellen mit neurogenem Potenzial kommt.

Es wird diskutiert, ob in neurogenen Zonen Zellen, die den astrozytären Marker GFAP exprimieren, eine Population neuronaler Vorläuferzellen darstellen, die die Fähigkeit besitzt, reife Neurone zu generieren (Doetsch et al., 1999; Kempermann et al., 2004; Seri et al., 2001). Einer gängigen Hypothese zur Folge, werden bei der hippocampalen Neurogenese im Gyrus dentatus drei Reifungsstadien (Zelltyp I-III) beobachtet, wobei GFAP exprimierende Zellen den Typ1-Stammzellen entsprechen. Sie koexprimieren den

Vorläuferzellmarker Nestin und werden ihrer Morphologie wegen auch als Radialglia-ähnliche Stammzellen bezeichnet (Kempermann et al., 2004).

Eine weitere Zellpopulation, deren Fähigkeit zur Neubildung von neuronalen Zellen intensiv untersucht wird, sind die O2A-Vorläuferzellen, eine Form von oligodendrozytären Vorläuferzellen (OPCs) (Engel & Wolswijk, 1996). Diese multipotenten Zellen können mature Oligodendrozyten und Typ-2-Astrozyten generieren und exprimieren das Chondroitinsulfat-Proteoglykan NG2 (Jones et al., 2002; Levine et al., 1996; McTigue et al., 2001; Nishiyama et al., 1996 & 1999 & 2001; Raff et al., 1983). Die Ergebnisse jüngster Studien sprechen dafür, dass zumindest eine Subpopulation dieser NG2 exprimierenden Zellen in vitro und in vivo Neurone generieren kann und in der Lage ist, sich zu GABA-ergen Interneuronen zu differenzieren (Aguirre et al., 2004; Belachew et al., 2003). NG2 exprimierende Zellen persistieren und proliferieren zeitlebens sowohl in neurogenen als auch in nicht neurogenen Arealen des Gehirns (Übersicht: Dawson et al., 2000) Ferner wurde gezeigt, dass NG2 exprimierende Vorläuferzellen in die Reaktion des zentralnervösen Gewebes auf verschiedenen Arten von Läsionen, wie traumatische Verletzungen oder Ischämie involviert sind (McTigue et al., 2001; Tanaka et al., 2001).

#### **1.4 Das 6-OHDA-Modell und der Marker Tyrosinhydroxylase**

Bei Nagetieren, wie Mäusen oder Ratten, ist das Auftreten einer dem PS vergleichbaren Erkrankung unbekannt. Zur tierexperimentellen Simulation dieses Krankheitsbildes wurden daher mehrere transiente pharmakologische sowie neurotoxische Modelle entwickelt. Zu den am besten validierten neurotoxischen Modellen zählt das 6-OHDA-Modell, welches in dieser Arbeit verwendet wurde.

6-Hydroxydopamin (6-OHDA) ist aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin ein Katecholamin-Zell-spezifisches Neurotoxin. Es entfaltet seine toxische Wirkung nach Aufnahme über Dopamintransporter und Oxidation zu reaktiven, instabilen Intermediärprodukten, wie 6-OHDA-Quinon, Peroxiden und Radikalen (Sachs & Jonsson, 1975). Dabei ist das Ausmaß der neurotoxischen Wirkung abhängig von Applikationsort, typischerweise SN, MFB, Striatum, VTA, sowie von Dosis und Injektionsgeschwindigkeit (Bezard et al., 1998). Daher lässt sich mit dieser Substanz eine in Bezug auf Zeitverlauf, Lokalisation und Ausmaß der dopaminergen Degeneration dem PS ähnliche Situation im Versuchstier erzeugen. Die einmalige intrastriatale Injektion führt zu einer selektiven, retrograden, progressiven Degeneration der in die Injektionsregion projizierenden dopaminergen nigralen Neurone. Diese Degeneration beginnt etwa eine Woche nach Injektion und erstreckt sich über acht bis 16 Wochen (Kirik et al., 1998; Sauer & Oertel, 1994). Zu Vergleichszwecken von lädiertes zu nicht lädiertes Seite wird die 6-OHDA-Läsion in der Regel unilateral durchgeführt. Histologische Kennzeichen der dopaminergen Degeneration sind Zellschrumpfung und –

atrophie. Immunhistochemisch kann die Quantifizierung der nigralen Läsion durch die Darstellung des Enzyms Tyrosinhydroxylase erfolgen, welches das Schrittmacherenzym der Katecholaminsynthese und das Markerenzym dopaminergener Neurone der SN ist (Nagatsu et al., 1964). Mittels dieser Methode wurde in den im Folgenden präsentierten Experimenten das Ausmaß der dopaminergen Läsion bestimmt und überprüft, ob es durch Lauftraining und reizreicher Umgebung zu einer Zunahme dopaminergener Neurone im Vergleich zu Kontrolltieren kommt.

### **1.5 Das Rotationsmodell nach Ungerstedt**

Mit dem Rotationsmodell nach Ungerstedt kann das Ausmaß der dopaminergen Degeneration nach unilateraler Läsion am lebendigen Tier quantifiziert werden (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970). Hierbei wird durch systemische Applikation von direkten Dopaminagonisten, wie Apomorphin, bzw. indirekten Dopaminagonisten, wie Amphetamin, ein Rotationsverhalten der lädierten Tiere ausgelöst. Im Striatum der lädierten Seite sind die dopaminergen Afferenzen degeneriert und die Dopaminkonzentration folglich erniedrigt (Pycock, 1980). Kompensatorisch erhöhen sich daher die Empfindlichkeit und die Anzahl der postsynaptischen striatalen Dopaminrezeptoren. Ein direkter Dopaminagonist wird demnach auf der lädierten Seite eine stärkere Wirkung entfalten als auf der nicht lädierten Seite und ein Rotationsverhalten kontraversiv zur Läsion auslösen. Im Gegensatz dazu ist ein indirekter Dopaminagonist auf das normale Vorkommen dopaminergener Neurone im Striatum angewiesen, denn er entfaltet seine Wirkung lediglich über eine Verstärkung der Dopaminausschüttung in den synaptischen Spalt. Auf der nicht lädierten Seite wird er daher stärker wirken können als auf der lädierten Seite und somit ein Rotationsverhalten ipsiversiv zur Läsion induzieren. Das Ausmaß dieses Rotationsverhalten in Rotationen pro Minute (U/min) korreliert dabei mit der Stärke der dopaminergen Läsion und der Dosis der applizierten Substanz (Hefti, 1980; Hudson, 1993; Ungerstedt & Arbuthnott, 1970). Dieses Modell diente in den hier präsentierten Experimenten zur Untersuchung der Frage, ob die zellulären Veränderungen, die durch reizreiche Umgebung und physische Aktivität induziert wurden, in der Lage waren, das motorische Verhaltensdefizit der 6-OHDA-lädierten Tiere zu kompensieren.

### **1.6 Herleitung der Fragestellung und Ziele der Arbeit**

Wie im Verlauf dieser Einleitung dargestellt, führen Physiotherapie und die Erfahrung des Neuen bei Patienten mit PS zu einer Abschwächung motorischer Defizite. Tierexperimentell konnten körperliche Aktivität und reizreiche Umgebung als wichtige Induktoren von Gliogenese und Neurogenese identifiziert werden. Weiter wurde gezeigt,

dass Dopaminmangel zu einer Reduktion der Neurogenese in Hippocampus und Bulbus olfactorius führt, obwohl die Bedeutung von Dopamin auf proliferative Prozesse im ZNS noch nicht abschließend geklärt ist. Gegenwärtig werden das Ausmaß, in dem die adulte SN zu zellulärer Plastizität fähig ist, und insbesondere ihre Fähigkeit zu adulter (dopaminerg) Neurogenese kontrovers diskutiert. Zur Klärung des Potenzials der adulten SN zu zellulärer Plastizität und der Bedeutung von Dopamin, reizreicher Umgebung und körperlicher Aktivität bei der Regulation dieses Potenzials, wurden in dieser Studie die Auswirkungen von reizreicher Umgebung und körperlicher Aktivität auf die zelluläre Plastizität der adulten SN nativer und 6-OHDA-lädierter Tiere untersucht. Der Nachweis von neurogenem Potential in der SN würde neue Wege der restaurativen Therapie eröffnen, in dem es prinzipiell möglich werden könnte, dieses intrinsische Potential der SN im Falle des PS therapeutisch zu nutzen. Die Induktion von zellulärer Plastizität und im Speziellen dopaminerg Neurogenese durch reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität könnten Physiotherapie und körperliche Aktivität von einer adjuvanten Therapie in den Rang einer zumindest ansatzweise restaurativen Therapie erheben. Eine Erweiterung unseres Verständnisses über die Neuropermissivität und Neurogenität der SN und deren Regulation, beispielsweise durch reizreiche Umgebung, körperliche Aktivität und Dopamin, eröffnet demnach neue potenzielle Therapieoptionen.

Auf Grundlage des bisher Erörterten wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Hypothesen aufgestellt und experimentell überprüft:

- Die 6-OHDA Läsion hat Auswirkungen auf die nigrale zelluläre Neurogenese der Ratte bei Haltung unter Standardbedingungen.
- Reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität haben Auswirkungen auf die nigrale zelluläre Neurogenese der nativen Ratte.
- Reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität haben Auswirkungen auf die nigrale zelluläre Neurogenese der 6-OHDA lädierten Ratte.
- Reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität induzieren die Differenzierung von proliferierenden nigralen Zellen zu (dopaminergen) Neuronen.
- Reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität beeinflussen das motorische Verhalten der 6-OHDA-lädieren Ratte.

## **2 Tiere, Material und Methoden**

### **2.1 Gesetzliche Bestimmungen**

Sämtliche Tierversuche oblagen den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes §8 Absatz 1 und wurden von der Senatsverwaltung für Gesundheit Berlin unter der Tierversuchsnummer TV 269/04 am 07.06.2005 genehmigt.

### **2.2 Experimentelles Design**

In dieser Studie wurden die Effekte von reizreicher Umgebung (enriched environment) und Lauftraining auf die zelluläre Plastizität in der adulten SN und auf das motorische Verhalten nativer sowie 6-OHDA lädierter Ratten getestet.

In der durchgeführten Versuchsreihe wurden n=48 Versuchstiere in vier experimentelle Gruppen zu je 12 Tieren eingeteilt. Nach einer Adaptationszeit im Tierstall an die neuen Haltungsbedingungen von einer Woche sowie, abhängig von der Versuchsgruppe, nach einem fünftägigen Lauftraining, erhielt die Hälfte der Versuchstiere eine 6-OHDA-Läsion und wurde dann für vier Wochen entweder unter enriched environment Bedingungen mit Lauftraining (erpd) oder unter Einzelhaltung mit Standardbedingungen (pd) gehalten. Die andere Hälfte der Versuchstiere erhielt keine 6-OHDA-Läsion und wurde ebenfalls unter enriched environment Bedingungen (ercontrol) und Lauftraining oder unter Einzelhaltung mit Standardbedingungen (control) für vier Wochen gehalten.

Alle Tiere erhielten einmal täglich intraperitoneale BrdU-Injektionen über 10 Tage vom 19. bis zum 28. Versuchstag. Somit erhielten die Tiere die Injektionen in den letzten 10 Tagen des Versuchs. Dieser Beobachtungszeitraum wurde gewählt, um sowohl Proliferationsinduktion als auch Differenzierungspotenzial zu erfassen und den Zeitverlauf dieser Phänomene beschreiben zu können.

Nach vier Wochen wurde das amphetamininduzierte Rotationsverhalten getestet.

Nach transkardialer Perfusion und histologischer Aufarbeitung wurde die SN der Versuchstiere auf zelluläre Veränderungen mittels immunhistochemischer sowie immunfluoreszenzmikroskopischer Verfahren untersucht und es folgte die statistische Auswertung.

Gruppen	erpd	ercontrol	pd	control
n-Zahl	12	12	12	12
Tag 1-33	Lauftraining	Lauftraining	-	-
Tag 5	6-OHDA-Läsion	-	6-OHDA-Läsion	-
Tag 24-33	BrdU	BrdU	BrdU	BrdU
Tag 33	Rotationstest	Rotationstest	Rotationstest	Rotationstest
Tag 33	Tötung	Tötung	Tötung	Tötung
post mortem	Histologie	Histologie	Histologie	Histologie
post mortem	Statistik	Statistik	Statistik	Statistik

Tab. 1 Schematische Darstellung der Versuchsabläufe.

## 2.3 Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen Sprague-Dawley Ratten aus der Versuchstierzuchtanstalt Harlan Winkelmann, Borcheln (Deutschland) durchgeführt. Zur stereotaktischen Operation betrug das Gewicht der Tiere zwischen 280 und 300g.

## 2.4 Haltungsbedingungen

### 2.4.1 Einzelhaltung unter Standardbedingungen

Die Tiere wurden in standardisierten Käfigen mit den Abmessungen 42×26×18cm alleine gehalten. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit Altromin 1324 Standard (Altromin, Lage, Deutschland). Die Tiere unterlagen einem 12 Stunden hell-dunkel Rhythmus (Tagesphase von 6.00 bis 18.00 Uhr). Die Temperatur betrug konstant 18°C und die Luftfeuchtigkeit lag bei 50%.



Abb. 2 Einzelhaltung unter Standardbedingungen.

#### **2.4.2 Reizreiche Umgebung**

Die Versuchstiere wurden in Gruppen zu je 6 Tieren in speziell angefertigten geräumigen Käfigen mit den Abmessungen 150×100×20cm gehalten (Werkstatt des pharmakologischen Instituts der Charité). Die Käfige waren ausgestattet mit einer geschützten Schlafstelle, Papierhandtüchern als Nestmaterial, einem System von Plastikröhren, Spielcordeln sowie einer Wippe. In den Hellphasen hielten sich die Ratten vorwiegend in der Schlafstelle oder in den Plastikröhren auf. Die räumliche Konfiguration der Plastikröhren wurde zweimal pro Woche verändert. Ebenso wurden die Papierhandtücher zweimal pro Woche ausgetauscht. Auf diese Veränderungen reagierten die Tiere jeweils kurzfristig mit einem gesteigerten explorativen Verhalten. Diese reizreiche Umgebung bot also mehr Platz, verbesserte Möglichkeiten der sozialen Interaktion, die Stimulation explorativen Verhaltens durch die erwähnten Objekte und Spielzeuge und damit erweiterte Lernmöglichkeiten. Alle weiteren Bedingungen waren den Standardbedingungen identisch.



Abb. 3 Haltung in reizreicher Umgebung.

## 2.5 Lauftraining

Alle Tiere, die unter enriched environment Bedingungen gehalten wurden, also je zur Hälfte 6-OHDA lädierte Tiere (erpd) sowie nicht lädierte Tiere (ercontrol), erhielten Lauftraining. Dieses wurde täglich für maximal 20 Minuten auf einem Laufrad (Rotarod, Columbus Instruments, Columbus, USA) durchgeführt. Zur Vermeidung von Stress wurde die Dauer des Trainings an die individuellen motorischen Fähigkeiten der Tiere angepasst. Die Tiere wurden entgegen der Rotationsrichtung auf dem Laufrad platziert, sodass sie vorwärts laufen mussten, um nicht vom Laufrad zu fallen. Vor Versuchsbeginn

wurde zur Gewöhnung der Tiere über einen Zeitraum von fünf Tagen ein Lauftraining durchgeführt von jeweils maximal 20 Minuten Dauer und einer Rotationsgeschwindigkeit von acht Rotationen pro Minute. Danach absolvierten alle Ratten ihr Training freiwillig. Während der Experimente wurden die Versuchstiere auf dem Laufrad wiederum täglich für bis zu 20 Minuten bei acht Rotationen pro Minute trainiert. Alle Versuchstiere tolerierten mindestens 10 Minuten Lauftraining. Das Lauftraining wurde vorzeitig beendet, wenn die Tiere zwei –bis dreimal vom Laufrad gefallen waren.

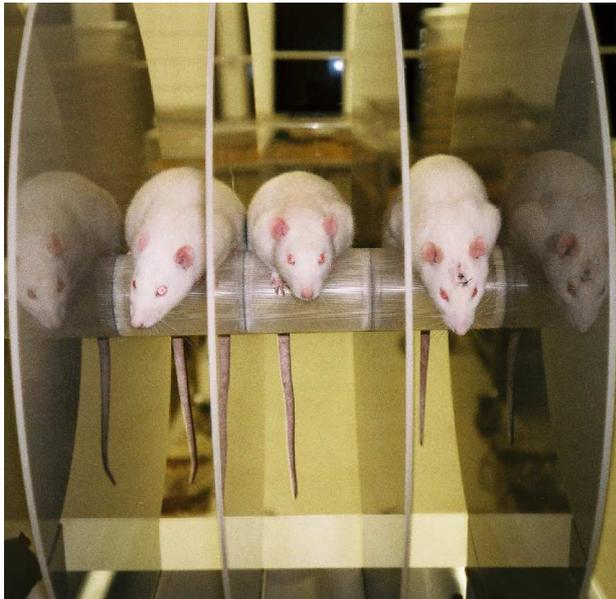


Abb. 4 Lauftraining auf dem Laufrad.

## 2.6 Verwendete Substanzen für Operation, Applikation und histologische Aufarbeitung

Substanz	Bezugsquelle
Pentobarbital Natrium	Krankenhausapotheke, Charité Berlin
6-Hydroxydopamin	SIGMA Chemical Company, St. Louis, USA
BrdU	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
d-Amphetaminsulfat	SIGMA Chemical Company, St. Louis, USA
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
3,3 Diaminobenzidindihydrochlorid	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Paraformaldehyd	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Kresylviolett	Merck, Darmstadt, Deutschland

Entellan®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ascorbinsäure	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Choralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenglykol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glyzerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphat Puffer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	SIGMA, Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Tween 20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Esel-Normalserum	Chemicon, Temecula, CA, USA
Ziegen-Normalserum	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Polyvinylalkohol	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Vectastain Elite	Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA
Nickelchlorid	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland

---

Tab. 2 Verwendete Substanzen mit Bezugsquellen.

## 2.7 Verwendete Lösungen

**PBS** (phosphate buffer solution), 1l bestehend aus Aqua dest., 9g Natriumchlorid, 29,1g Dinatriumhydrogencarbonat, 2,63g Natriumdihydrogencarbonat, pH 7,4.

**TBS** (Tris buffer solution), 1l bestehend aus Aqua dest., 8,8g Natriumchlorid, 37ml 1N HCl, 6,1g Tris, pH 7,6.

**CPS** (cryoprotectant solution), 1l bestehend aus 250ml Glyzerin, 250ml Ethylenglykol, 500ml Phosphatpuffer (0,1M, pH 7,4, Natriumdihydrogencarbonat und Dinatriumhydrogencarbonat).

**Boratpuffer** 1l bestehend aus Aqua dest., 6,16g Borsäure, 5N Natriumhydroxid zum Tritrieren des pH auf 8,5.

**PVA-DABCO** (Polyvinylalkohol-Diazabiklooktan), bestehend aus 12g Glycerin, 4,8g Polyvinylalkohol, 12ml Aqua dest, 24ml 0,2M Tris pH 8-8,5, 2,5 Vol% DABCO.

## **2.8 Stereotaktische Operationen und intrazerebrale Mikroinjektionen**

Die intrastriatale 6-OHDA-Läsion ist ein etabliertes Tiermodell für das Parkinson Syndrom (Sauer & Oertel, 1994; Ungerstedt, 1968). In dieser Studie wurde eine unilaterale, intrastriatale 4-Punkt-Läsion mit einer Gesamtdosis von 28 µg 6-OHDA durchgeführt (Kirik et al., 1998).

Die männlichen Sprague-Dawley Ratten wurden initial mit Pentobarbital (Konzentration 50mg/kg KG gelöst in 0,9% NaCl) intraperitoneal anästhesiert. Es wurde auf diese Weise eine ca. 1-1,5 stündige Narkose erreicht, die ausreichte für die Durchführung des ca. 40 Minuten dauernden Eingriffs. Nach Rasur der Kopfhaut erfolgte die Fixation in einen stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) mittels zweier Interauralstifte und einem Incisorstift, der auf -3,3mm eingestellt wurde. Anschließend wurden eine linksseitige paramediane Inzision und die Freilegung des Periosts durchgeführt. Nach Darstellung des Bregmas als Bezugspunkt wurde die Kalibrierung der anterioren und lateralen Koordinaten gemäß der stereotaktischen Koordinaten der intrazerebralen Zielstrukturen (siehe Tab. 3) aus dem Atlas von Paxinos und Watson vorgenommen (Paxinos & Watson, 1998). Mit einem Dentalbohrer (Durchmesser: 1,0mm) wurde die Schädeldecke gemäß den anterioren und lateralen Koordinaten kleinfächig eröffnet. An der Trepanationsstelle wurde an der Dura mater die Kalibrierung für die ventrale Koordinate vorgenommen. Darauf folgte die vorsichtige Absenkung der an einem stereotaktischen Arm befestigten Injektionskanüle bis zur ventralen Koordinate. Die Injektionskanüle (Außendurchmesser 25µm) war über einen Polyethylenschlauch mit einer Mikroliterspritze (CR 400-20, Hamilton Company, Reno, USA) verbunden. Es folgte die Applikation der 6-OHDA-Lösung (3,5µg/µl 6-OHDA, [Sigma Chemical Company, St. Louis, USA] in 0,9% NaCl mit 0,1% Ascorbinsäure) mit einem Volumen von 2µl pro Koordinate und einer Applikationsgeschwindigkeit von 1µl/min. Nach der Toxininjektion wurde die Injektionskanüle noch jeweils 5 Minuten in entsprechender Position belassen bevor die langsame Retraktion erfolgte. Nach Wundsäuberung wurde ein Wundverschluss mit jeweils drei Einzelkopfnähten durchgeführt. Zur postoperativen Analgesie erhielten die Tiere 50µl Novaminsulfon.

Koordinaten	anterior	lateral	ventral
Punkt 1	1,3 mm	2,6 mm	5,0 mm
Punkt 2	0,4 mm	3,0 mm	5,0 mm
Punkt 3	-0,4 mm	4,2 mm	5,0 mm
Punkt 4	-1,3 mm	4,5 mm	5,0 mm

Tab. 3 Koordinaten der striatalen Injektionsorte bezogen auf das Bregma nach Paxinos & Watson, 1998.

## 2.9 BrdU-Applikation

Die systemische Applikation von Bromdesoxyuridin (BrdU, Sigma, Deutschland) wurde über einen Zeitraum von zehn Tagen einmal täglich intraperitoneal in einer Konzentration von 50ml/kg KG durchgeführt. Vor der Applikation wurde das BrdU in einer Konzentration von 10mg/ml in 0,9% NaCl gelöst und filtriert (Kempermann et al., 1997; Steiner et al., 2004; Van Praag et al., 1999). Diese Konzentration ist ausreichend um ohne Nebenwirkungen im Applikationszeitraum mitotisch aktive Zellen zuverlässig zu markieren und bereits mehrfach vorbeschrieben (Kempermann et al., 1997; siehe auch: 1.3.1 Detektion proliferativer Prozesse im ZNS – der Marker BrdU). Es wurde ein Zeitraum von zehn Tagen zur Aufsättigung von BrdU gewählt um Differenzierungsprozesse der proliferierenden Zellen darzustellen (Ehninger & Kempermann, 2003). Die BrdU-Injektionen wurden ab dem 19. Tag post lesionem durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde aus mehreren Gründen gewählt. Zum einen sind die degenerativen Prozesse in der SN nach 18 Tagen bereits in vollem Gange (Sauer & Oertel, 1994; siehe auch: 1.4.6 OHDA-Modell und der Marker Tyrosinhydroxylase). Zum anderen steht noch genügend Zeit bis zum Versuchsende zur Verfügung zur Differenzierung der proliferierenden Zellen. Des Weiteren sollten so eventuelle Artefakte der neurochirurgischen 6-OHDA-Applikationsoperation vermieden werden.

## 2.10 Rotationsverhalten

Das amphetamininduzierte Rotationsverhalten wurde untersucht zur in vivo Objektivierung der Stärke der unilateralen Läsion des nigrostriatalen Systems sowie zur Objektivierung von funktionellen Veränderungen des motorischen Verhaltens unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970). Dieser Test wurde vier Wochen post lesionem durchgeführt, also am Ende des Beobachtungszeitraumes. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um mögliche Auswirkungen

des applizierten Amphetamins und des im Rahmen dieses Tests induzierten Stresses auf die Neurogenese so gering wie möglich zu halten. Dazu wurde 2,725 mg/kg/KG d-Amphetaminsulfat in 0,9% NaCl gelöst und ein Volumen von 0,5 ml/kg/KG intraperitoneal injiziert. Nach einer fünfminütigen Anflutphase wurden die Tiere einzeln in einer Rotameterhalbschale (TSE, Bad Homburg, Deutschland) positioniert und über einen semiflexiblen Stahldraht, der die Bewegungsfreiheit der Ratte gewährleistete, mit dem Bewegungssensor verbunden. Die Anzahl der Umdrehungen nach ipsilateral zur Läsion wurde über 60 Minuten aufgezeichnet. Über ein Computerprogramm wurde der Netto-Rotations-Asymmetrie-Score (rechts/links) berechnet, ausgedrückt als Rotationen in 180 Grad pro Minute.



Abb. 5 Versuchsanordnung und repräsentativer Ausschnitt des amphetamininduzierten Rotationsverhaltens.

### **2.11 Transkardiale Perfusion**

Nach Abschluss der Experimente nach vier Wochen wurden alle Versuchstiere mittels i.p. Injektion von Chloralhydrat (500mg/kg KG in 0,9% NaCl) tief anästhesiert bei gleichzeitiger Sicherung der kardialen Pumpfunktion. Es folgten die mediane Thorakothomie und die Darstellung des Herzens. Nach Inzision des rechten Atriums zur vorläufigen Entblutung wurde die Eröffnung des Apex cordis und die Einführung einer an einer Förderpumpe angeschlossenen Knopfkanüle durch das linke Herz in die Aorta ascendens vorgenommen. Über diese Kanüle, die mit einer Aortenklemme fixiert wurde, erfolgte nun die systemische Perfusion mit zunächst 80 ml körperwarmer PBS zur Spülung des vaskulären Systems und anschließend mit 200 ml 4%-iger eisgekühlter Paraformaldehydlösung zur Fixierung des Gewebes.

### **2.12 Fixierung und Aufarbeitung der Gehirne**

Nach Dekapitation und Präparation des Gehirns vom Schädelknochen wurde dieses entnommen und dann zur Postfixierung in 4% Paraformaldehydlösung für zwölf Stunden gelagert bevor die Dehydrierung mittels 20% Succroselösung erfolgte. Zur histologischen

Aufarbeitung wurde das fixierte Gehirn in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Propanol auf  $-60^{\circ}\text{C}$  bis  $-80^{\circ}\text{C}$  für 50 Sekunden gelagert und dann auf Korkplättchen aufgefroren. Es wurden mit einem Gefriermikrotom (Cryostat 1800, Reichert-Jung, Deutschland)  $40\mu\text{m}$  dicke koronare Serienschnitte vom Corpus striatum und von der Pars compacta der Substantia nigra angefertigt. Jeder zweite striatale Schnitt wurde direkt auf einen Objektträger aufgezogen und der Kresylviolett färbung zugeführt zur histologischen Sicherung der korrekten Kanülenposition. Alle weiteren Schnitte wurden in CPS, einer kryoprotektiven Lösung aufbewahrt für die spätere histologische Auswertung.

Region	anteriore Begrenzung	posteriore Begrenzung
Corpus striatum	2,2 mm	-3,3 mm
SNc	-4,8 mm	-6,3 mm

Tab. 4 Koordinaten des Corpus striatum und der Substantia nigra, Pars compacta (SNc) in Bezug zum Bregma, nach Paxinos & Watson, 1998.

## 2.13 Histologische Aufarbeitung

### 2.13.1 Kresylviolett färbung nach Nissl

Die zu färbenden Objektträger wurden für jeweils 5 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und entfettet (70% Ethanol, 90% Ethanol, 96% Ethanol, Propanol, Xylol) und dann in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Propanol, 96% Ethanol, 90% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua dest.). Sodann folgte eine zweiminütige Färbung mit dem wasserlöslichen Farbstoff Kresylviolett (1%-ig in Aqua dest.) und die Spülung mit destilliertem Wasser. Der Färbevorgang wurde beendet mit einer aufsteigenden Alkoholreihe zur erneuten Dehydrierung (70% Ethanol, 90% Ethanol, 96% Ethanol, Propanol) und folgender Inkubation in Xylol über 15 Minuten sowie Lufttrocknung der gefärbten Schnitte. Es schloss sich nun die Eindeckelung der Präparate mit dem Einbettungsmedium Entellan® an.

### 2.13.2 Immunhistochemie

Antikörper gegen	Bezugsquelle	Immunisierungssystem	Verdünnung
BrdU	Seralab	Ratte	1:500
TH	Calbiochem	Kaninchen	1:500

Tab. 5 Auflistung verwendeter Primärantikörper.

Antikörper gegen	Bezugsquelle	Immunisierungssystem	Markierung	Verdünnung
Ratte	Dianova	Esel	Biotin	1:500
Kaninchen	SIGMA	Ziege	Biotin	1:200

Tab. 6 Auflistung verwendeter Sekundärantikörper.

#### 2.13.2.1 BrdU-Färbung

Alle bei der Färbung notwendigen Spülvorgänge wurden dreifach je fünfminütig mit 0,1 M TBS durchgeführt. Die Schnitte wurden nach Überführung aus CPS in TBS und Spülvorgang zunächst zur Blockade endogener Peroxidasen mit 0,6% Wasserstoffperoxid für 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Spülvorgang erfolgte die Inkubation mit 2 N HCl für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius zur Denaturierung der DNA. Danach wurde für zehn Minuten in 0,1 M Boratpuffer inkubiert (pH 8,5) bevor die Schnitte dann nach einem weiteren Spülvorgang einer Behandlung mit TBS $\oplus$  (96% TBS, 1% Triton X-100 10%, 3% Eselserum) für 30 Minuten unterzogen wurden zur Permeabilisierung der Zellmembranen. Anschließend wurde der primäre anti-BrdU-Antikörper zugegeben (Konzentration 1:500 in TBS $\oplus$ ) und die Schnitte wurden bei vier Grad Celsius über Nacht gelagert. In dieser Zeit erfolgte die spezifische Antigen-Antikörperreaktion. Es folgte nach einem weiteren Spülvorgang mit TBS und TBS $\oplus$  bei Raumtemperatur die zweistündige Inkubation mit dem biotinylierten anti-Ratte-Sekundärantikörper, der spezifisch den Fc-Teil des Primärantikörpers erkennt (Konzentration 1:500). Nach einem Spülvorgang wurde der Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Reagenz, Vectastain Elite, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für eine Stunde in einer Konzentration von 9 $\mu$ l/ml TBS zugegeben. Das Glykoprotein Avidin besitzt eine hohe Affinität ( $10^{-15}$ M) zu Biotin und bindet es an vier Stellen, was zu einer Potenzierung des Signals führt. Im nun folgenden Schritt reagierte der Farbstoff DAB (Diaminobenzidin, SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland, Konzentration: 0,25 mg/ml in TBS) mit dem ABC-Komplex nach Zugabe von 0,01% Wasserstoffperoxid als Starter und 0,4% Nickelchlorid. Die biotinassoziierte Peroxidase aus dem AB-Komplex, deren Substrat Wasserstoffperoxid ist, katalysierte die

Polymerisierung von DAB und visualisierte somit die Stellen der vorangegangenen Antikörperbindung, da das entstandene Polymer im Gegensatz zum Monomer braun gefärbt ist. Die Färbereaktion wurde beendet durch dreimalige kurze Inkubation der Schnitte in Leitungswasser und folgende dreimalige Inkubation in TBS.

#### *2.13.2.2 Tyrosinhydroxylase- (TH) Färbung*

Alle bei der Färbung notwendigen Spülvorgänge wurden dreifach je fünfminütig mit 0,05 M PBS durchgeführt. Die Schnitte wurden nach Überführung aus CPS in PBS und Spülvorgang zunächst zur Blockade endogener Peroxidasen mit 0,6% Wasserstoffperoxid für 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Spülvorgang erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen Primärantikörper gegen die Tyrosinhydroxylase der Ratte (Konzentration 1:500 in PBS). Danach wurden die Schnitte bei 37 Grad Celsius über Nacht gelagert. Es folgte nach einem weiteren Spülvorgang mit PBS bei Raumtemperatur die zweistündige Inkubation mit dem biotinylierten anti-Kaninchen-Sekundärantikörper aus der Ziege, der spezifisch den Fc-Teil des Primärantikörpers erkennt (Konzentration 1:200). Nach einem Spülvorgang wurde der Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Reagenz, Vectastain Elite, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für eine Stunde in einer Konzentration von 5µl/ml PBS zugegeben. Im folgenden Schritt erfolgte die Visualisierung der der Antigen-Antikörper-Reaktion durch den Farbstoff DAB (Diaminobenzidin, SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland, Konzentration: 0,25 mg/ml in TBS) nach Zugabe von 0,01% Wasserstoffperoxid. Die Färbereaktion wurde beendet durch Abpipettieren der Färbelösung und wiederholte Spülung mit PBS.

### 2.13.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Antikörper gegen	Bezugsquelle	Immunisierungssystem	Verdünnung
BrdU	Seralab	Ratte	1:500
NG2	Chemicon	Kaninchen	1:200
GFAP	Advanced Immunochemistry	Meerschweinchen	1:1000
Iba-1	Drs.Imai & Kohsaka, National Institute of Neuroscience,Tokyo, Japan	Kaninchen	1:500
TH	Calbiochem	Kaninchen	1:500
NeuN	Chemicon	Maus	1:100
Doublecortin	Santa Cruz	Ziege	1:200
CNPase	Abcam	Maus	1:100

Tab. 7 Auflistung verwendeter Primärantikörper.

Antikörper gegen	Bezugsquelle	Markierung	Verdünnung
Ratte	Dianova	Rhodamin X	1:250
Meerschweinchen	Dianova	Cy5	1:250
Kaninchen	Dianova	FITC	1:250
Maus	Dianova	FITC	1:250

Tab. 8 Auflistung verwendeter Sekundärantikörper.

Alle bei der Färbung notwendigen Spülvorgänge wurden dreifach je fünfminütig mit 0,1 M TBS durchgeführt. Die Schnitte wurden nach Überführung aus CPS in TBS und Spülvorgang zunächst in 2 N HCl für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius zur Denaturierung der DNA inkubiert. Danach wurde für zehn Minuten in 0,1 M Boratpuffer gelagert (pH 8,5), bevor die Schnitte dann nach zwei ausgiebigen Spülvorgängen einer Inkubation mit TBS $\oplus\oplus$  (95% TBS, 1% Triton X-100 10%, 1% Tween 20, 3% Eselserum) für 30 Minuten unterzogen wurden. Anschließend wurden die Primärantikörper in unterschiedlicher Konzentration in TBS $\oplus\oplus$  hinzugegeben und die Schnitte wurden bei

vier Grad Celsius über 48 Stunden gelagert. Es folgte sodann nach einem weiteren Spülvorgang mit TBS und TBS $\oplus$  bei Raumtemperatur die vierstündige lichtgeschützte Inkubation mit den Sekundärintikörpern. Abschließend folgte ein letzter Spülvorgang mit TBS.

## **2.13.4 Aufziehen der Schnitte auf den Objektträger**

### *2.13.4.1 Immunhistochemie*

Nach abgeschlossenem immunhistochemischen Färbevorgang wurden die frei flottierenden Schnitte aus Aqua dest. auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (90% Ethanol, 96% Ethanol, Propanol, Xylol für jeweils 30 Sekunden) und anschließend mit Entellan® (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

### *2.13.4.2 Immunfluoreszenz*

Nach abgeschlossener Immunfluoreszenzfärbung wurden die frei flottierenden Schnitte aus 0,1 M Phosphatlösung auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet, eingedeckelt in einer Lösung aus Polyvinylalkohol und Diazabiclo-oktan zur Konservierung der Leuchtkraft der Chromophoren. Es folgte die Lagerung bei vier Grad Celsius in Dunkelheit.

## **2.14 Auswertung und Statistik**

### **2.14.1 Histologische Kontrolle der Kanülenposition**

Jeder zweite striatale Schnitt wurde direkt auf Objektträger aufgezogen und der Kresylviolett-färbung zugeführt zur histologischen Sicherung der korrekten Kanülenposition. Nur Ratten mit akkurater Position der Kanülen in den intrastriatalen Zielstrukturen wurden in die Datenauswertung eingeschlossen.

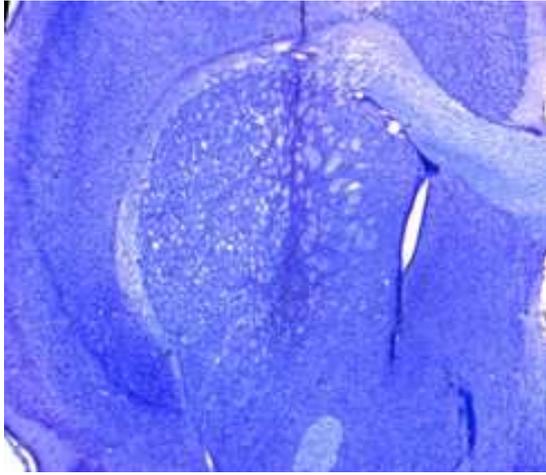


Abb. 6 Koronares Schnittpräparat nach Kresylviolett-färbung durch das linke Corpus striatum. Dargestellt ist der vertikal verlaufende Stichkanal zum Nachweis der korrekten Kanülenposition.

#### 2.14.2 Histologische Quantifizierung von TH- immunreaktiven Zellen

Zur Quantifizierung der TH- immunreaktiven Zellen aus den Hirnschnitten wurde ein systematisches Zählprotokoll verwendet (Gundersen, 1988). Als interessierende Region (brain region of interest), wurde die komplette SN definiert. Jeweils jeder sechste Schnitt in anterioposteriorer Ausdehnung der SN (Entfernung bei 40 $\mu$ m-Schnitten 240  $\mu$ m) wurde für die immunhistochemische TH-Färbung verwendet. Es wurden somit ungefähr acht nigrale Schnitte pro Tier auf TH- positive Zellen untersucht. Die Begrenzungen der SN wurden bestimmt anhand ihrer Beziehungen zu anderen intrazerebralen anatomischen Leitstrukturen sowie mittels des Rattenhirnatlasses von Paxinos und Watson (Paxinos & Watson, 1998). Die Gesamtzahl der immunreaktiven Zellen wurde unter Verwendung des semiautomatischen stereologischen Analysesystems StereoInvestigator (MicroBrightfield, Magdeburg, Deutschland) in Kombination mit einer Hitachi HV-C20A Video Camera und einem Leica DM-RXE Mikroskop ermittelt. Die tatsächliche Schnittdicke nach dem Färbeprogang wurde mittels Z-Achsen-Mikroskop an zufällig ausgewählten Orten gemessen und lag bei durchschnittlich 20  $\mu$ m. Die stereologische Auswertung wurde wie von dem Programm vorgegeben durchgeführt. Es wurden durchschnittlich 101.4 $\pm$ 1,3 Zählrahmen ausgewertet. Folgende Parameter wurden für alle Messungen verwendet (nach Schmitz & Hof, 2005): Zählrahmenfläche (XY): 10000,0  $\mu$ m<sup>2</sup>, Zählrahmendicke (Z): 10,0  $\mu$ m, Zählrahmenvolumen (XYZ): 100000,0  $\mu$ m<sup>3</sup>, Zählrahmenbreite (X): 100,0  $\mu$ m, Zählrahmenhöhe (Y): 100,0  $\mu$ m. Probengitter (X): 200,0  $\mu$ m, (Y) 200,0  $\mu$ m, Probengitterfläche (XY): 40000,0  $\mu$ m<sup>2</sup>. Bei Verwendung des 10x Objektivs wurden die Grenzen der SN auf jedem Schnitt markiert. Das Zählen der immunreaktiven Zellen erfolgte mit dem 40x Objektiv. Immunreaktive Zellen, die über die oberste fokale Ebene

oder die Ausschlusslinien des Zählrahmens hinausragten, gingen nicht in die Zählung ein. Der Fehlerkoeffizient aufgrund der Schätzung wurde nach Gundersen & Jensen (1987) berechnet und lag zwischen 0,05 und 0,1. Die Anzahl der TH-immunreaktiven Zellen wurde ausgedrückt als Prozentwert der kontralateralen unlädierten Seite.

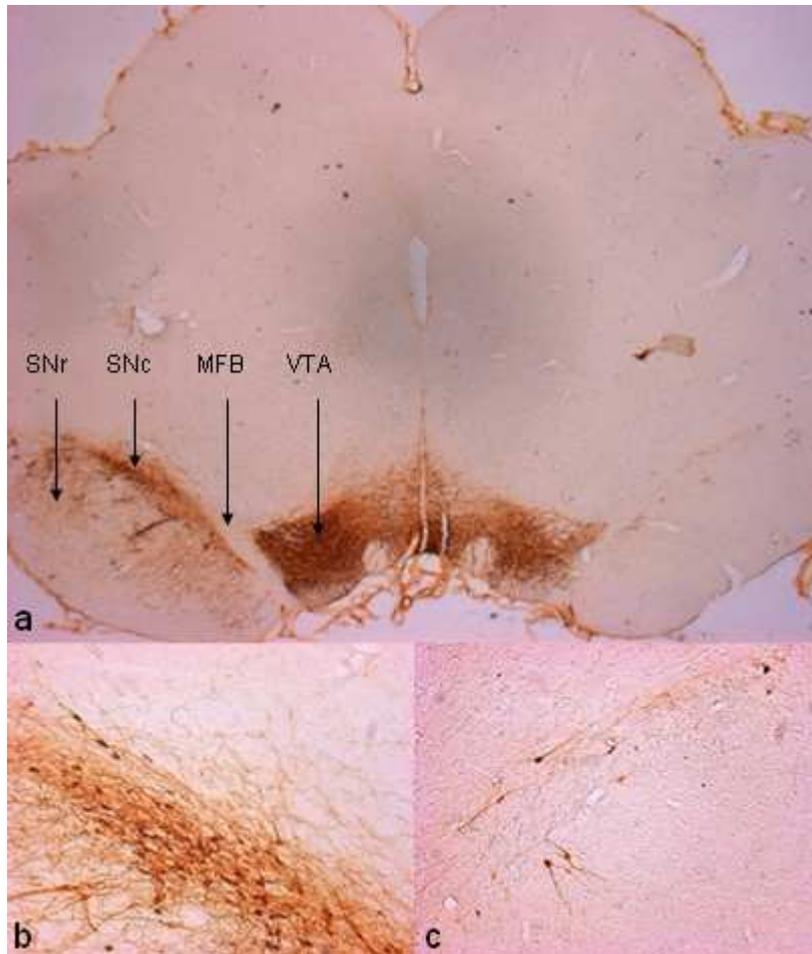


Abb. 8 Koronare Schnittpräparate nach TH-Immunfärbung und unilateraler 6-OHDA-Läsion der SN. Deutliche linksseitige Reduktion TH- positiver Neurone. a. Übersichtsvergrößerung. b. Detailvergrößerung. SNc: Substantia nigra, pars compacta. SNr: Substantia nigra, pars reticulata. MFB: Mediales Vorderhirnbündel. VTA: Ventrales tegmentales Areal.

### 2.14.3 Histologische Quantifizierung von BrdU- positiven Zellen

Schnittserien und Schnittfolgen waren identisch zu der oben beschriebenen Auswertung der immunhistochemischen TH-Färbung. Ebenso das Vorgehen zur Eingrenzung der SN. Da sich in der SN jedoch zu wenige BrdU- positive Zellen befanden, war eine valide semiautomatische stereologische Auswertung nicht möglich. Es wurde daher die manuelle schnittweise Auszählung der BrdU- positiven Zellen vorgenommen. Um die Zellzahl der kompletten Struktur zu erhalten, wurden diese Werte bei Auszählung jedes sechsten

Schnittes mit sechs multipliziert.

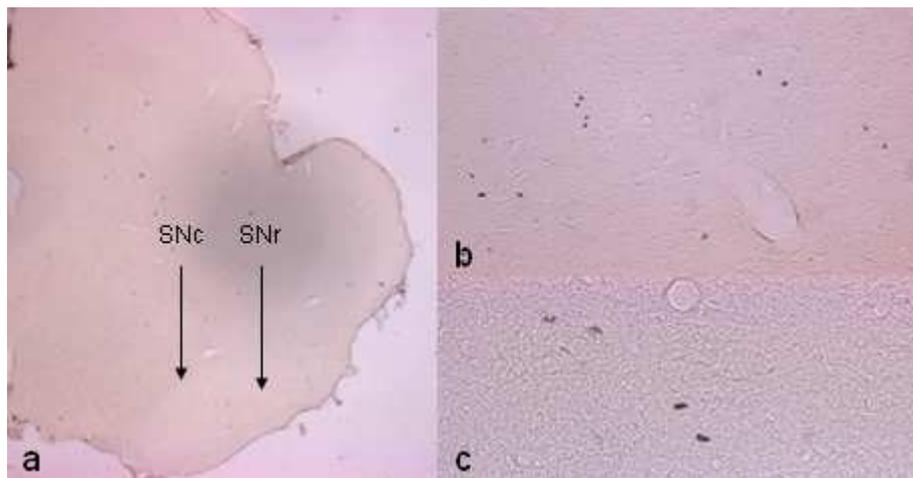


Abb. 9 Koronare Schnittpräparate nach BrdU-Immunfärbung mit Nachweis nigraler BrdU- positiver Zellen. a. Übersichtsvergrößerung. b. Mittlere Vergrößerung mit Darstellung der SNc. c. Detailvergrößerung. SNc: Substantia nigra, pars compacta. SNr: Substantia nigra, pars reticulata.

#### 2.14.4 Histologische Quantifizierung von mehrfach markierten Zellen

Die Auswertung der fluoreszenzmarkierten Schnitte erfolgte mittels Konfokalmikroskopie. Es wurde das spektrale Mikroskop Leica TCS SP2 verwendet, ein Laser-Rastermikroskop (CLSM, confocal laser scanning microscope). Bei der Konfokalmikroskopie tastet von Lasern erzeugtes Anregungslicht selektiv einzelne Ebenen des Präparates ab und detektiert die verwendeten Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzmoleküle, in dieser Arbeit FITC, Rhodamin und Cy5. Informationen aus anderen Ebenen werden unterdrückt und es wird eine praktisch überlagerungsfreie Darstellung optischer Schnitte von einer Dicke bis zu einem  $\mu\text{m}$  erreicht. Dadurch wird die Zuordnung von optischen Signalen zu einer Zelle möglich und es kann determiniert werden, ob eine Kolokalisation von Immunreaktivitäten innerhalb einer Zelle vorliegt. Dazu dient ferner die Verwendung von Z-Schnittserien, also die Untersuchung von Kolokalisationen in vielen verschiedenen Ebenen einer Zelle.

Jeder zwölfte Schnitt der SN wurde mehrfach markiert und histologisch ausgewertet. Jeweils fünfzig über die gesamte SN verteilte, zufällig ausgewählte BrdU-positive Zellen wurden auf Kolokalisation mit glialen und neuronalen Markern untersucht. Die Anzahl von doppeltmarkierten Zellen wurde angegeben als Verhältnis zu der Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen. Durch Multiplikation mit der absoluten Anzahl BrdU positiver Zellen ergab sich die absolute Anzahl BrdU positiver Zellen mit dem jeweiligen Phänotyp. Alle Bilder wurden im sequentiellen Aufnahmemodus angefertigt und mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop 7.0 für Macintosh bearbeitet. Es wurden lediglich

allgemeine Kontrast- und Helligkeitsanpassungen vorgenommen. Darüber hinaus erfolgte keine weitere Manipulation.



Abb. 7 Exemplarische konfokalmikroskopische Abbildung einer nigralen doppelgefärbten Zelle. Simultane Visualisierung von nukleärem BrdU (rot) und membrangebundenem NG2 (blau) in einer Zelle.

#### **2.14.5 Statistische Auswertung**

Die statistischen Vergleiche wurden mittels one-way-ANOVA (analysis of variance) durchgeführt. Wo nach ANOVA-Ergebnis zulässig, wurde ein Posthoc-Test nach Fisher angewandt. Alle Daten wurden dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde für alle Daten als signifikant angenommen. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programmen Excel 2003, Statview 5.0.1 und Sigma Plot 9.0 durchgeführt.

### **3 Ergebnisse**

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden die Ergebnisse der Untersuchung der Auswirkungen von 6-OHDA-Läsion und reizreicher Umgebung mit Lauftraining auf die Anzahl TH-positiver Neurone der adulten SN dargestellt. Im zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse der amphetamininduzierten Rotationsprüfung dargelegt, um die funktionelle Bedeutung der Veränderung der Anzahl TH-positiver Neurone zu verdeutlichen. Im dritten Abschnitt dann werden die Auswirkungen der experimentellen Bedingungen, 6-OHDA-Läsion und reizreiche Umgebung mit Lauftraining, auf die Zellproliferation in der SN geschildert. In den weiteren Abschnitten werden die Ergebnisse der Phänotypisierung der BrdU-positiven Zellen je nach Komarkierung mit NG2, GFAP, Iba-1 und anderen Markern präsentiert.

Dabei folgen alle Abschnitte jeweils der gleichen Systematik. Es werden immer Vergleiche angestellt zwischen 6-OHDA-lädierten Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden (pd) mit Kontrolltieren, die unter identischen Bedingungen gehalten wurden (control), um die Auswirkung der 6-OHDA-Läsion unter Standardbedingungen darzustellen. Dann werden 6-OHDA-lädierte Tiere, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (erpd), mit 6-OHDA-lädierten Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden (pd) verglichen, um die Auswirkungen von reizreicher Umgebung mit Lauftraining auf 6-OHDA-lädierte Tiere darzustellen. Es folgt die Gegenüberstellung von Kontrolltieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (ercontrol) mit Kontrolltieren, die bei Standardbedingungen gehalten wurden (control), um den Effekt von reizreicher Umgebung mit Lauftraining auf Kontrolltiere zu verdeutlichen. Zuletzt werden 6-OHDA-lädierte Tiere, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (erpd) mit Kontrolltieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (ercontrol) verglichen zur Darstellung von Effekten der 6-OHDA-Läsion auf Tiere, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden.

Der abschließende Abschnitt enthält eine Zusammenfassung des Kapitels unter Berücksichtigung der wichtigsten Ergebnisse.

#### **3.1 Auswirkungen von 6-OHDA-Läsion und reizreicher Umgebung mit Lauftraining auf die Anzahl TH-positiver Neurone in der adulten SN**

Das Ausmaß der 6-OHDA-Läsion und die damit verbundene Degeneration des nigrostriatalen dopaminergen Systems wurden evaluiert durch die Tyrosinhydroxylase (TH)-Immunreaktion mit anschließender bilateraler Zählung TH-positiver Neurone in der SN. Es folgte die Verhältnissbildung zwischen lädierter und nicht lädierter Seite, wobei

die Anzahl der TH-positiven Neurone der lädierten Seite als Prozentwert der unlädierten Seite ausgedrückt wurde (Abb. 10).

Vier Wochen post lesionem wurde bei 6-OHDA-lädierten Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden (pd), eine Reduktion der Anzahl TH- positiver Neurone auf  $15,19\% \pm 8,78\%$  der kontralateralen nicht lädierten Seite festgestellt. Die 6-OHDA-Läsion bei Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden, reduzierte somit vier Wochen post lesionem, signifikant die Anzahl der TH-positiven Neurone auf der lädierten Seite der SN.

Bei nicht lädierten Kontrolltieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden, ergab die histologische Auswertung nach vier Wochen (control)  $96,26\% \pm 23,46\%$  der TH-positiven Neurone der kontralateralen nicht lädierten Seite. Bei 6-OHDA-lädierten Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden, ergab die Zellzählung vier Wochen post lesionem (erpd) SN  $12,19\% \pm 3,80\%$  der TH- positiven Neurone der kontralateralen nicht lädierten Seite der SN. Somit führte die 6-OHDA-Läsion bei Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden, genauso wie bei Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden, zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Anzahl TH- positiver Neurone auf der lädierten Seite der SN.

Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den 6-OHDA-lädierten Gruppen in reizreicher Umgebung mit Lauftraining (erpd) und den 6-OHDA-lädierten Gruppen unter Standardkonditionen (pd). Reizreiche Umgebung und Lauftraining führten somit vier Wochen post lesionem nicht zu einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Anzahl dopaminerger Neurone in der SN 6-OHDA-lädierter Tiere.

Nicht lädierte Kontrolltiere, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden, wiesen nach vier Wochen (ercontrol)  $99,22\% \pm 16,27\%$  der TH- positiven Neurone auf. Es ergab sich somit kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den unlädierten Gruppen unter enriched environment Bedingungen mit Lauftraining (ercontrol) und den unlädierten Gruppen unter Standardkonditionen (control). Reizreiche Umgebung und Lauftraining führten somit nach vier Wochen nicht zu einer signifikanten Veränderung der Anzahl TH-positiver Neurone in der SN von unlädierten Tieren.

## TH- positive Neurone nach 4 Wochen in der SN

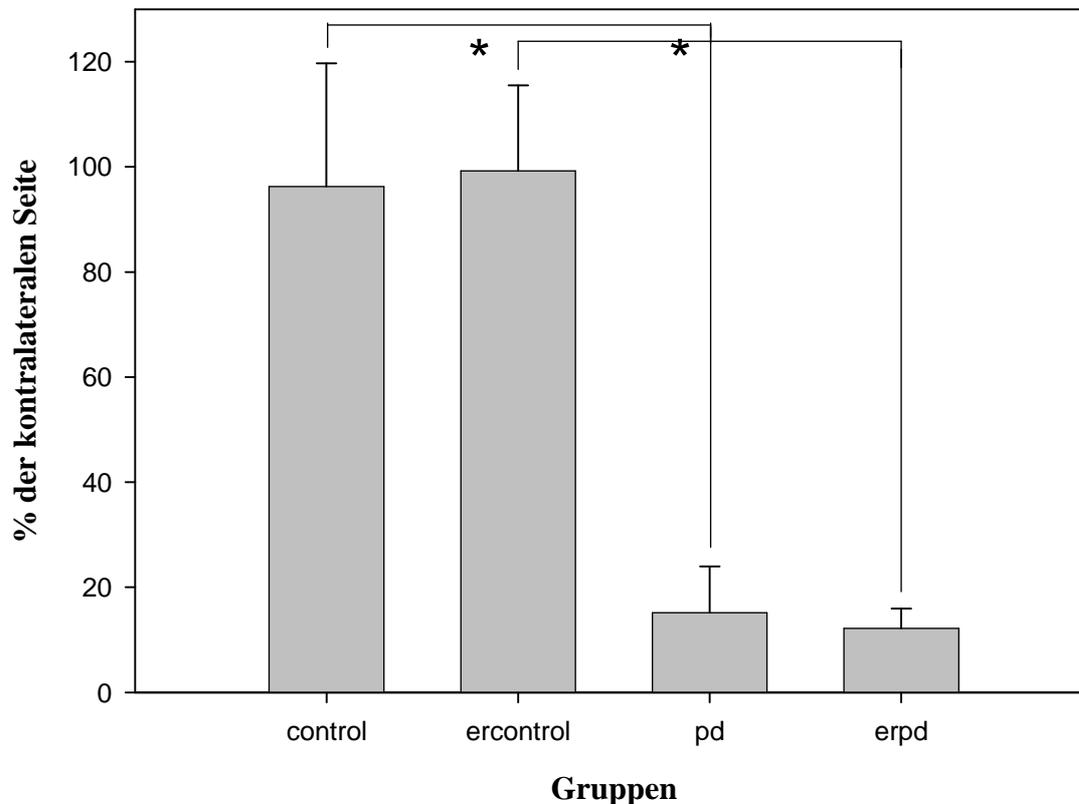


Abb. 10 Prozentualer Anteil der TH- positiven Neurone in Relation zur kontralateralen, nicht lädierten Seite für die einzelnen experimentellen Gruppen. \*  $p < 0,05$ . Daten als Mittelwert und Fehler als S.E.M. Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen control und pd sowie ercontrol und erpd.

### 3.2 Ergebnisse der Prüfung des amphetamininduzierten Rotationsverhaltens

Zur funktionellen Evaluierung des Ausmaßes der dopaminergen Degeneration nach intrastriatale 4-Punkt-Läsion und zur Einschätzung der funktionellen Bedeutung von Änderungen der nigralen Zellproliferation wurde das amphetamininduzierte Rotationsverhalten der Versuchstiere getestet (Abb. 11).

Vier Wochen post lesionem wurden bei Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden (pd), unter Amphetaminapplikation durchschnittlich  $12,94 \pm 1,50$  U/min (Umdrehungen pro Minute) beobachtet. Bei nicht lädierten Kontrolltieren unter Standardbedingungen (control) wurden nach vier Wochen  $0,50 \pm 0,2$  U/min registriert. Die intrastriatale 4-Punkt-Läsion führte somit vier Wochen post lesionem, zu einem

signifikant verstärktem Rotationsverhalten im Vergleich zu unlädierten Tieren unter identischen Haltungsbedingungen.

Vier Wochen post lesionem wurden bei 6-OHDA-lädierten Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (erpd), nach Amphetaminapplikation durchschnittlich  $13,64 \pm 1,60$  U/min (Umdrehungen pro Minute) beobachtet. Bei dem Beobachtungszeitpunkt nach vier Wochen ergab sich demzufolge keine statistisch signifikante Differenz zwischen 6-OHDA-lädierten Tieren, die unter Standardkonditionen gehalten wurden (pd) zu 6-OHDA-lädierten Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (erpd).

Für nicht lädierte Tiere, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (ercontrol), ergaben sich nach vier Wochen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Rotationsverhaltens im Vergleich zu nicht lädierten Tieren, die unter Standardkonditionen gehalten wurden; ercontrol:  $0,80 \pm 0,50$ , control  $0,50 \pm 0,20$  U/min.

### Amphetamininduziertes Rotationsverhalten nach 4 Wochen

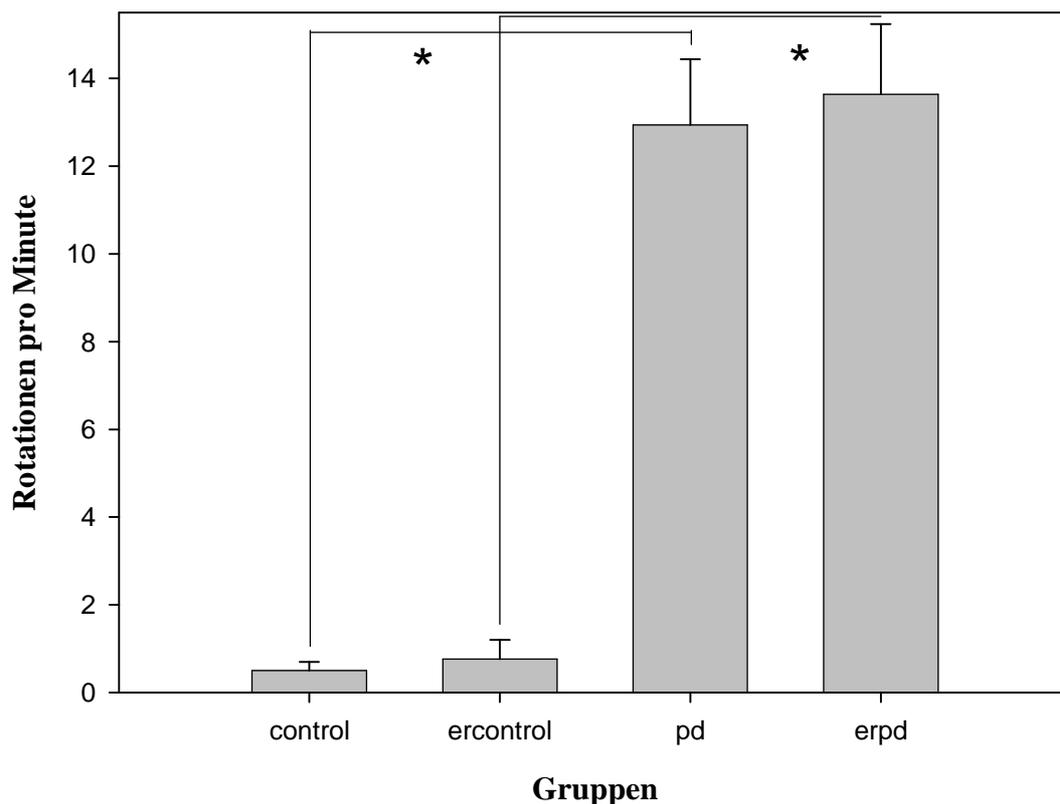


Abb. 11 Amphetamininduziertes Rotationsverhalten nach 4 Wochen für die einzelnen experimentellen Gruppen. \*  $p < 0,05$ . Daten als Mittelwert und Fehler als S.E.M. Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen control und pd sowie ercontrol und erpd.

### **3.3 Auswirkungen von 6-OHDA-Läsion und reizreicher Umgebung mit Lauftraining auf die Zellproliferation der adulten SN**

Die Auswirkungen von 6-OHDA-Läsion und reizreicher Umgebung mit Lauftraining auf die Zellproliferation der adulten SN in den verschiedenen experimentellen Gruppen sind in graphischer Form in Abb. 12 dargestellt. Die im Folgenden genannten Zahlenwerte beziehen sich jeweils auf die linke SN, also die Seite, auf der bei den entsprechenden experimentellen Gruppen die 6-OHDA-Läsion erfolgte (pd, erpd).

Bei 6-OHDA-lädierten Tieren unter Standardbedingungen (pd) wurden durchschnittlich  $1168,00 \pm 97,76$  BrdU-positive Zellen detektiert. Bei nicht lädierten Kontrolltieren unter Standardbedingungen (control) wurden durchschnittlich  $1477,80 \pm 94,76$  Zellen festgestellt. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Die 6-OHDA-Läsion bei Haltung in Standardbedingungen hatte also keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die nigrale Zellproliferation.

Bei Haltung in reizreicher Umgebung mit Lauftraining betrug die Anzahl der neu gebildeten BrdU-positiven Zellen bei 6-OHDA-lädierten Tieren (erpd)  $2033,50 \pm 183,50$ . Damit war die Zahl der neu gebildeten, BrdU-positiven Zellen post lesionem bei Haltung in reizreicher Umgebung mit Lauftraining (erpd) statistisch signifikant erhöht im Vergleich zu Haltung unter Standardbedingungen (pd). Reizreiche Umgebung mit Lauftraining induzierte sogar eine Steigerung der Zellproliferation um fast das Doppelte in der 6-OHDA-lädierten SN adulter Ratten.

In reizreicher Umgebung mit Lauftraining betrug die Zahl BrdU-positiver Zellen bei nicht lädierten Kontrolltieren (ercontrol)  $1953,63 \pm 115,60$ . Damit war die Anzahl BrdU-positiver Zellen bei nicht lädierten Kontrolltieren, die in reizreicher Umgebung gehalten wurden (ercontrol), statistisch signifikant höher als bei nicht lädierten Kontrolltieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden (control). Reizreiche Umgebung mit Lauftraining induzierte folglich eine statistisch signifikante Steigerung der Zellproliferation in der SN nativer Ratten. Die Anzahl BrdU-positiver Zellen von nicht lädierten Tieren in reizreicher Umgebung mit Lauftraining (ercontrol) war zudem ähnlich wie die von 6-OHDA-lädierten Tieren unter identischen Haltungsbedingungen (erpd). Bei Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden, hatte die 6-OHDA-Läsion folglich keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die nigrale Zellproliferation.

In sämtlichen experimentellen Gruppen wurden praktisch identische Zahlen BrdU-positiver Zellen ipsilateral und kontralateral gezählt. Die 6-OHDA-Läsion hatte also keinen statistisch signifikanten Einfluss auf unilaterale Proliferationsvorgänge (Abb. 12). Dies traf in Vorexperimenten auch auf die konfokale Typisierung zu. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse der konfokalen Phänotypisierung beziehen sich daher stets auf die linke und damit die lädierte Seite in den experimentellen Gruppen, die eine 6-OHDA-

Läsion erhielten (er, erpd).

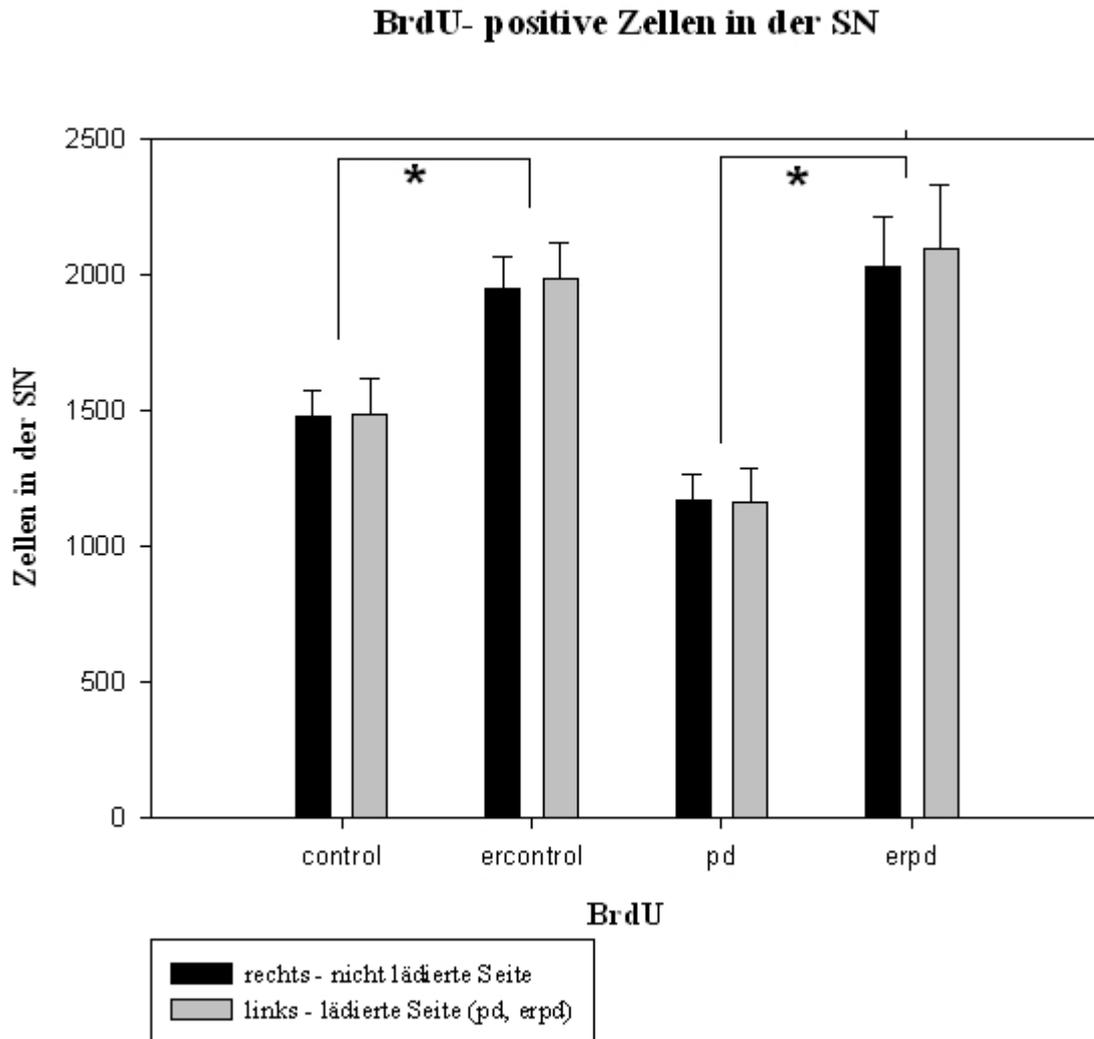


Abb. 12 Anzahl der BrdU- positiven nigralen Zellen für die einzelnen experimentellen Gruppen getrennt nach Seiten. \*  $p < 0,05$ . Daten als Mittelwert und Fehler als S.E.M. Die Läsionen wurden auf der linken Seite durchgeführt (er, erpd). Zwischen rechter und linker Seite bestanden keine signifikanten Unterschiede. Zwischen den Gruppen control und ercontrol sowie pd und erpd besteht ein signifikanter Unterschied.

### 3.4 Phänotypische Charakterisierung BrdU-positiver Zellen in der adulten SN der Ratte

#### 3.4.1 NG2

Der Anteil NG2- positiver Zellen an den BrdU- positiven nigralen Zellen in den verschiedenen experimentellen Gruppen ist graphisch in Abb. 13 verdeutlicht.

Unter Standardbedingungen betrug bei 6-OHDA-lädierten Tieren (pd) die Anzahl BrdU/NG2-positiver Zellen  $223,32 \pm 51,88$ . Bei nicht lädierten Kontrolltieren unter identischen Haltungsbedingungen (control) betrug diese Zahl  $418,00 \pm 234,00$ . Diese deskriptive Reduktion BrdU/NG2-positiver Zellen ist statistisch jedoch nicht signifikant. Die 6-OHDA-Läsion hatte demnach keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Proliferationsaktivität von BrdU/NG2- positiven Zellen.

Bei 6-OHDA-lädierten Tieren mit Haltung in reizreicher Umgebung und Lauftraining (erpd) wurden  $853,26 \pm 204,00$  BrdU/NG2- positive Zellen festgestellt. Somit führte bei 6-OHDA-lädierten Tieren Haltung in reizreicher Umgebung mit Lauftraining zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Anzahl BrdU/NG2- positiver Zellen im Vergleich zu Haltung unter Standardbedingungen (pd).

Bei nicht lädierten Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (ercontrol), wurden durchschnittlich  $880,80 \pm 325,80$  BrdU/NG2- positive Zellen gezählt. Es liegt somit eine deskriptive aber statistisch knapp nicht signifikante Steigerung der Anzahl BrdU/NG2- positiver Zellen bei nicht lädierten Tieren in reizreicher Umgebung mit Lauftraining (ercontrol) vor im Vergleich zu nicht lädierten Tieren unter Standardbedingungen (control). Des Weiteren konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden zwischen 6-OHDA-lädierten Tieren (erpd) und nicht lädierten Tieren (ercontrol), die jeweils in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden.

## BrdU/NG2- positive Zellen

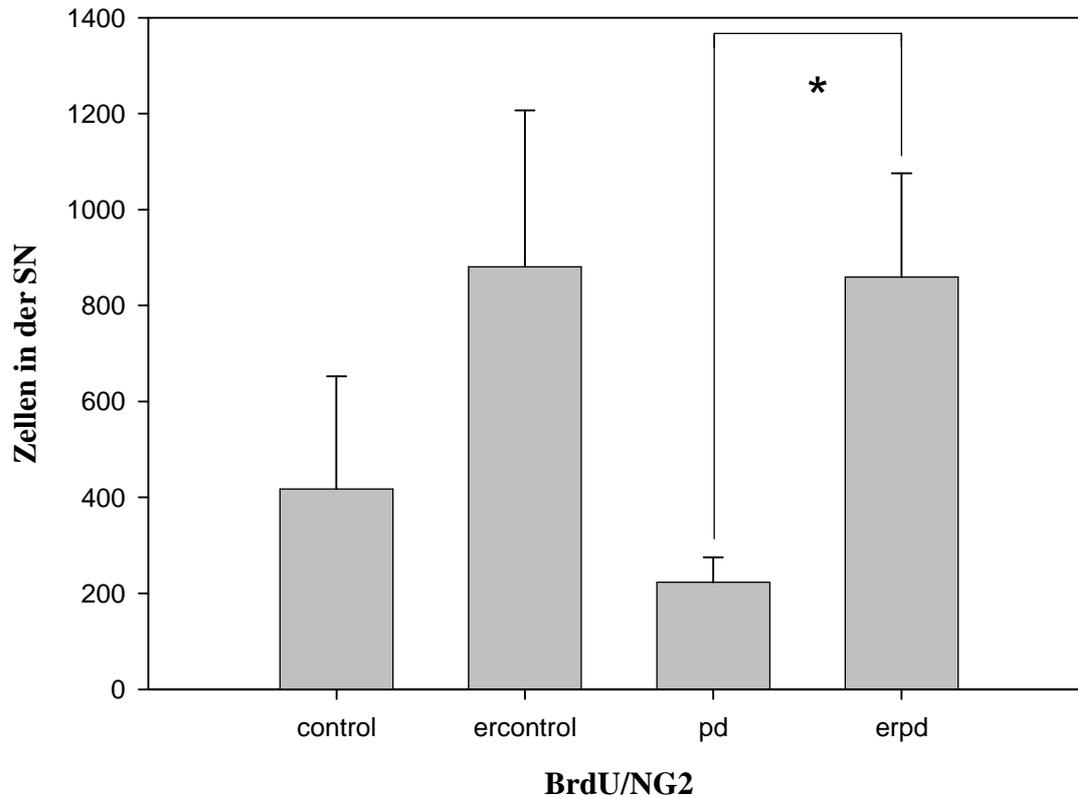


Abb. 13 Anzahl der BrdU/NG2- positiven nigralen Zellen für die einzelnen experimentellen Gruppen. \*  $p < 0,05$ . Daten als Mittelwert und Fehler als S.E.M. Es liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen pd und erpd vor.

### 3.4.2 GFAP

Der Anteil GFAP- positiver Zellen an den BrdU- positiven nigralen Zellen in den verschiedenen experimentellen Gruppen ist graphisch in Abb. 14 verdeutlicht.

Bei Tieren mit 6-OHDA-Läsion, die unter Standardbedingungen gehalten wurden (pd), ergab die Quantifizierung  $26,77 \pm 8,90$  BrdU/GFAP- positive Zellen. Bei nicht lädierten Kontrolltieren, die unter identischen Bedingungen gehalten wurden (control), wurden  $175,46 \pm 48,61$  BrdU/GFAP- positive Zellen gezählt. Diese Differenz ist statistisch signifikant. Die 6-OHDA-Läsion führt also zu einer statistisch signifikanten Reduktion BrdU/GFAP- positiver Zellen unter Standardbedingungen.

Bei 6-OHDA-lädierten Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (erpd), wurden  $125,42 \pm 58,39$  BrdU/GFAP- positive Zellen gezählt. Hier liegt eine deskriptive, aber statistisch nicht signifikante Steigerung der Anzahl BrdU/GFAP- positiver Zellen bei 6-OHDA-lädierten Tieren in reizreicher Umgebung mit Lauftraining

(erpd) im Vergleich zu 6-OHDA-lädierten Tieren unter Standardbedingungen (pd) vor. Bei nicht lädierten Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (ercontrol), ergab die Zellzählung  $151,73 \pm 62,19$  BrdU/GFAP- positive Zellen. Damit ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten von nicht lädierten Tieren in reizreicher Umgebung mit Lauftraining (ercontrol) im Vergleich zu nicht lädierten Kontrolltieren unter Standardbedingungen (control). Des Weiteren konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden zwischen 6-OHDA-lädierten Tieren (erpd) und nicht lädierten Tieren (ercontrol), die jeweils in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden.

### BrdU/GFAP- positive Zellen

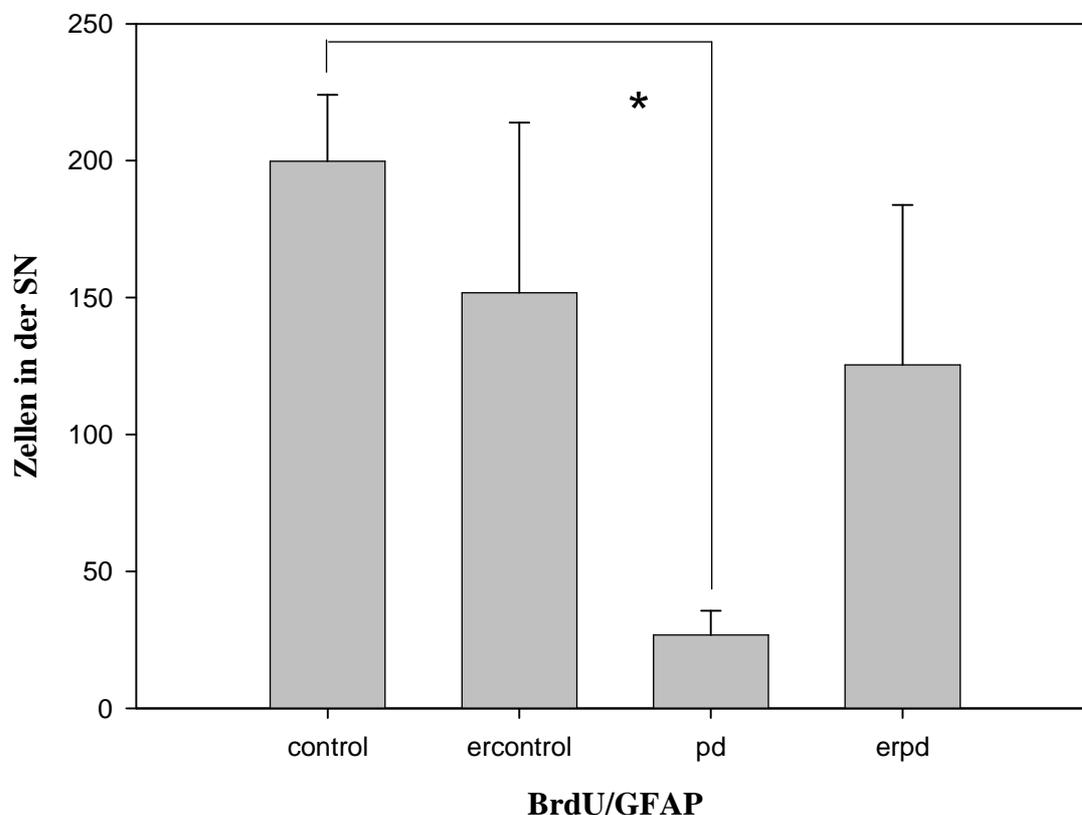


Abb. 14 Anzahl der BrdU/GFAP- positiven nigralen Zellen für die einzelnen experimentellen Gruppen. \*  $p < 0,05$ . Daten als Mittelwert und Fehler als S.E.M. Es liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen control und pd vor.

#### 3.4.3 Iba-1

Der Anteil Iba-1- positiver Zellen an den BrdU- positiven nigralen Zellen in den

verschiedenen experimentellen Gruppen ist graphisch in Abb. 15 verdeutlicht.

In der SN 6-OHDA-lädierter Tiere, die unter Standardbedingungen gehalten wurden (pd), wurden  $76,30 \pm 28,79$  BrdU/Iba-1- positive Zellen gezählt. Bei nicht lädierten Kontrolltieren, die unter identischen Bedingungen gehalten wurden (control), ergab die Quantifizierung  $202,81 \pm 69,69$  solcher Zellen. Die 6-OHDA-Läsion unter Standardbedingungen führte also zu einer deskriptiven, jedoch statistisch nicht signifikanten Reduktion von BrdU/Iba-1- positiver Zellen.

Bei 6-OHDA-lädierten Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (erpd), ergab die histologische Auswertung  $351,0 \pm 145,80$  BrdU/Iba-1- positive Zellen. Es liegt damit eine deskriptive, statistisch jedoch nicht signifikante Steigerung der Anzahl der BrdU/Iba-1- positiver Zellen bei 6-OHDA-lädierten Tieren, die in reizreicher Umgebung gehalten wurden (erpd), vor im Vergleich zu 6-OHDA-lädierten Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden (pd).

Bei nicht lädierten Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden (ercontrol), ergab die Zellzählung  $396,87 \pm 57,21$  BrdU/Iba-1- positive Zellen. Es liegt damit deskriptive, statistisch jedoch nicht signifikante Steigerung der Anzahl der BrdU/Iba-1- positiver Zellen bei nicht lädierten Tieren, die in reizreicher Umgebung gehalten wurden (ercontrol), vor im Vergleich zu nicht lädierten Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden (control). Reizreiche Umgebung mit Lauftraining erhöhte somit deskriptiv sowohl bei 6-OHDA-lädierten Tieren als auch bei nicht lädierten Tieren die Expression von BrdU/Iba-1- positiven Zellen. Allerdings waren diese Erhöhungen weder für 6-OHDA-lädierte Tiere noch für nicht lädierte Tiere statistisch signifikant. Des Weiteren konnte eine deskriptive aber statistisch nicht signifikante Reduktion von BrdU/Iba-1- positiven Zellen festgestellt werden bei 6-OHDA-lädierten Tieren (erpd) im Vergleich zu nicht lädierten Tieren (ercontrol), die jeweils in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden.

### BrdU/Iba-1- positive Zellen

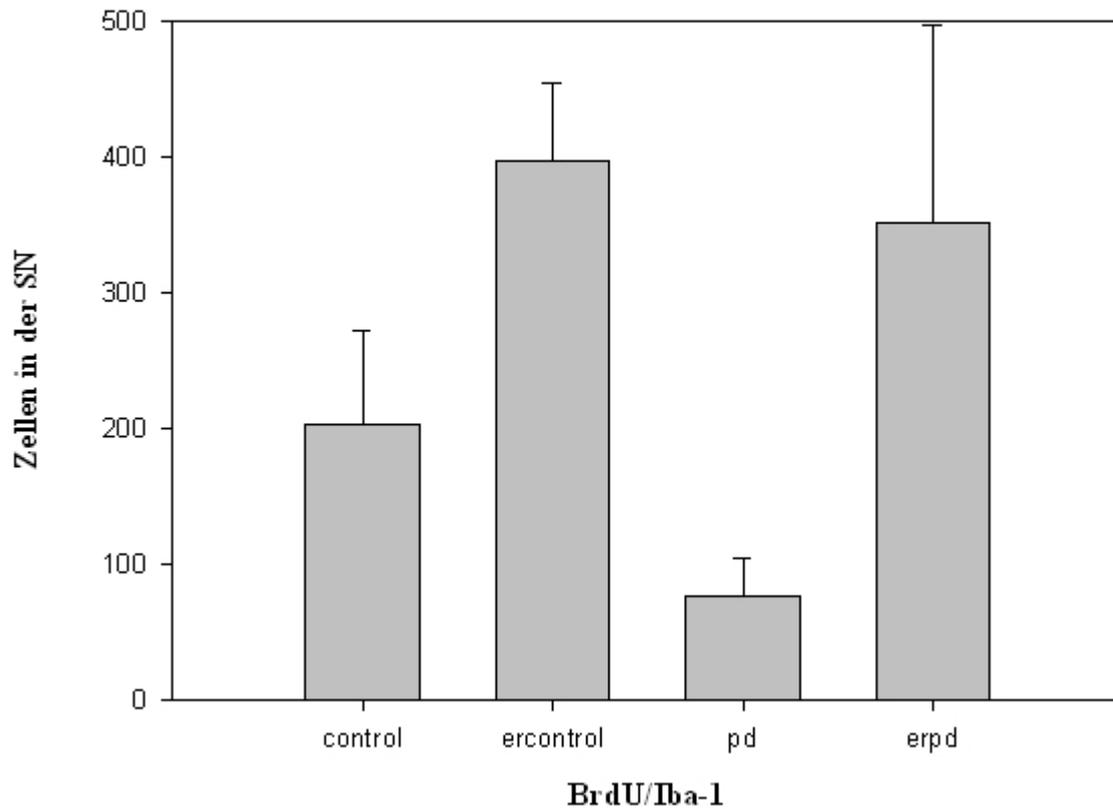


Abb. 15 Anzahl der BrdU/Iba-1- positiven nigralen Zellen für die einzelnen experimentellen Gruppen. Daten als Mittelwert und Fehler als S.E.M. Es ergeben sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% keine signifikanten Differenzen zwischen für die Vergleiche control zu pd, control zu ercontrol, pd zu erpd, ercontrol zu erpd.

#### 3.4.4 Weitere Marker

Es wurden in keiner der experimentellen Gruppen BrdU- positive Zellen detektiert, die den maturaen oligodendrozytären Marker CNPase, den immaturnen neuronalen Marker Doublecortin oder die maturaen neuronalen Marker NeuN und TH koexprimierten.

### **3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse**

#### **3.5.1 Welche Auswirkungen hat die 6-OHDA-Läsion auf die nigrale zelluläre Neogenese unter Standardbedingungen?**

Bei Haltung von Tieren unter Standardbedingungen wird nach 6-OHDA-Läsion keine signifikante Änderung der Anzahl BrdU- positiver Zellen in der SN beobachtet. Es kommt im Gegenteil zu einer deskriptiven Reduktion von neu gebildeten Zellen in der SN. Die Phänotypisierung der BrdU- positiven Zellen ergab, dass es unter diesen Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion von BrdU/GFAP- positiven Zellen kam. Die Phänotypisierung der BrdU- positiven Zellen hinsichtlich Kolokalisation mit NG2 und Iba-1 zeigte keine signifikanten Unterschiede.

#### **3.5.2 Haben reizreiche Umgebung und physische Aktivität einen Einfluss auf die nigrale zelluläre Neogenese der nativen Ratte?**

Bei Haltung der nicht lädierten Tiere in reizreicher Umgebung mit physischer Aktivität in Form von Lauftraining wurde eine signifikante Erhöhung der Anzahl nigraler BrdU- positiver Zellen im Vergleich zu unter Standardbedingungen gehaltenen Kontrolltieren beobachtet. Die Phänotypisierung der BrdU- positiven Zellen hinsichtlich Kolokalisation mit NG2, GFAP und Iba-1 zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Kontrolltieren, obwohl es zu einer deskriptiven Steigerung von BrdU- positiven Zellen mit NG2 und Iba-1 Komarkierungen kam.

#### **3.5.3 Haben reizreiche Umgebung und physische Aktivität einen Einfluss auf die nigrale zelluläre Neogenese der 6-OHDA-lädierten Ratte?**

Bei Haltung der 6-OHDA-lädierten Tiere in reizreicher Umgebung mit physischer Aktivität wurde eine signifikante Erhöhung der Anzahl nigraler BrdU- positiver Zellen im Vergleich zu unter Standardbedingungen gehaltenen 6-OHDA-lädierten Tieren festgestellt. In dieser experimentellen Gruppe wurden die größte Anzahl BrdU- positiver Zellen beobachtet. Die Phänotypisierung der BrdU- positiven Zellen ergab, dass es unter diesen Bedingungen zu einer signifikanten Steigerung von BrdU/NG2- positiven Zellen kam. Ferner wurden deskriptive Steigerungen BrdU/GFAP- positiver sowie BrdU/Iba-1- positiver Zellen beobachtet.

#### **3.5.4 Kommt es unter den experimentellen Bedingungen zur Differenzierung proliferierender Zellen der SN in (dopaminerge) Neurone?**

Bei keiner einzigen der phänotypisierten nigralen BrdU- positiven Zellen wurde eine Kolokalisation mit dem neuronalen Marker NeuN oder dem Marker eines dopaminergen neuronalen Phänotyps TH beobachtet und zwar unabhängig von der experimentellen

Gruppe.

### **3.5.5 Haben reizreiche Umgebung und physische Aktivität einen Einfluss auf das motorische Verhalten der 6-OHDA-lädierten Ratte?**

Die vier Wochen post lesionem durchgeführte Prüfung des amphetamininduzierten Rotationsverhaltens ergab keine signifikanten Differenzen zwischen 6-OHDA-lädierten Tieren, die in reizreicher Umgebung mit physischer Aktivität gehalten wurden und 6-OHDA-lädierten Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden. Nicht lädierte Tiere, unabhängig davon, ob die Haltung unter Standardbedingungen oder in reizreicher Umgebung mit physischer Aktivität erfolgte, zeigten praktisch kein Rotationsverhalten.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Übersicht**

Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis über das Potenzial der zellulären Plastizität der adulten SN sowie deren Regulation zu erweitern. Es wurden hierbei die Auswirkungen von reizreicher Umgebung und körperlicher Aktivität in Form von Lauftraining auf dem Laufrad auf die zelluläre Plastizität der adulten SN untersucht. Insbesondere sollte die Frage geklärt werden, ob unter diesen Versuchsbedingungen neuronale Vorläuferzellen generiert werden, die zu dopaminergen Neuronen heranreifen und ob es zu Veränderungen der Proliferation von Zellen mit glialen Markern kommt. Die Untersuchungen erfolgten sowohl im nativen Tier als auch nach Dopamindepletion im 6-OHDA-Modell des PS für progressive nigrostriatale Degeneration.

Es konnte erstmalig durch diese Arbeit gezeigt werden, dass reizreiche Umgebung und Lauftraining sowohl in nativen als auch in 6-OHDA-lädierten Tieren zu einer signifikanten Steigerung der Zellproliferation in der SN führten. Dabei induzierten diese experimentellen Bedingungen eine verstärkte Bildung von GFAP- und NG2- positiven glialen Zellen. Neu gebildete neuronale Zellen wurden in keiner unserer experimentellen Gruppen gefunden.

Die folgende Diskussion reflektiert das Phänomen der zellulären Plastizität der adulten SN und deren Regulation durch reizreiche Umgebung und Lauftraining auf Grundlage der in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse und im Kontext von Erkenntnissen aus der aktuellen Literatur. Der Methodenkritik folgend, soll zunächst auf die Bedeutung der in der SN proliferierenden Zellen eingegangen werden. Nach der Diskussion der wichtigen Frage der Neurogenität der SN werden zunächst die Veränderungen der Zellproliferation und –differenzierung nach 6-OHDA-Läsion erörtert. Darauf folgt ein Abschnitt, der die Veränderungen der Zellproliferation und –differenzierung in reizreicher Umgebung und Lauftraining diskutiert. Ein weiterer Abschnitt widmet sich den funktionellen Ergebnissen und deren Bezug zu den beobachteten Veränderungen der nigralen Proliferation und Differenzierung. Die Diskussion schließt mit der Erörterung klinisch relevanter Aspekte, die sich durch diese Arbeit ergeben.

### **4.2 Methodenkritik**

#### **4.2.1 Tiere und Tierhaltung**

Die experimentellen Daten, die aus Tierversuchen gewonnen werden, sind prinzipiell nur begrenzt und nicht vorbehaltlos auf die humane Situation übertragbar. Diese Studie untersuchte die Auswirkungen von körperlicher Aktivität und reizreicher Umgebung auf

die zelluläre Proliferation und Differenzierung in der SN. Hierbei ist einschränkend zu bedenken, dass sich die Umgebung, in der sich die Versuchstiere befanden, sehr stark von der natürlichen Umgebung frei lebender Tiere unterscheidet. So entspricht die Situation in freier Wildbahn einer viel komplexeren Umgebung als die hier verwendete „reizreiche Umgebung“, die sich lediglich im Vergleich zu der unphysiologischen Standardkäfighaltung durch Reizreichtum auszeichnet. Im Vergleich zu den natürlichen Lebensbedingungen ist somit davon auszugehen, dass unsere reizreiche Umgebung in Wahrheit einer Reizdeprivation entspricht (Cummings et al., 1977). Ebenso verhält es sich mit der körperlichen Aktivität, die bei unseren Versuchstieren mittels eines täglichen 20-minütigen Lauftrainings sichergestellt wurde. Die motorischen Anforderungen an frei lebende Tiere werden wahrscheinlich deutlich höher sein. Trotzdem sind vergleichende Rückschlüsse und prinzipielle Aussagen über proliferative Prozesse in der SN unter den verschiedenen Bedingungen der Reizdeprivation und reizreichen Umgebung sowie der körperlichen Passivität und Aktivität möglich. Beide Modelle sind allgemein akzeptiert und validiert, was auch die Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext erleichtert (Kempermann et al., 1997; Kim et al., 2002; van Praag et al., 1999).

#### **4.2.2 Das 6-OHDA-Modell als Tiermodell des PS**

Bei Ratten, wie auch bei anderen Nagern, kommt eine dem PS vergleichbare Erkrankung nicht vor. Daher kann diese Krankheit lediglich durch Tiermodelle simuliert werden. In dieser Studie wurde eines der am besten validierten Modelle des PS, das 6-OHDA-Modell, welches bereits seit 1968 etabliert ist, verwendet (Ungerstedt, 1968). Die progressive Degeneration der dopaminergen Neurone kann in diesem Modell gut imitiert werden durch einen auf das Leben der Ratte bezogenen ähnlichen progressiven Zeitverlauf des partiellen dopaminergen Funktionsverlustes wie beim Menschen (Kirik et al., 1998; Sauer & Oertel, 1994). Dies wird erreicht durch Injektion des Toxins 6-OHDA in Kombination mit Vitamin C, einem Antioxidans, was zu einer selektiven, retrograden und progressiven Degeneration der in die Injektionsregion projizierenden dopaminergen nigralen Neurone führt. Diese Degeneration beginnt etwa eine Woche nach Injektion und erstreckt sich über acht bis 16 Wochen (Kirik et al., 1998; Sauer & Oertel, 1994). Zum Zeitpunkt der histologischen Aufarbeitung betrug die Anzahl der TH positiven Zellen in 6-OHDA-lädierten Tieren  $15,19\% \pm 8,78\%$  der nicht lädierten Gegenseite bei Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden und  $12,19\% \pm 3,80\%$  der nicht lädierten Gegenseite bei Tieren, die in reizreicher Umgebung mit physischer Aktivität gehalten wurden. Bei Tieren, die keine 6-OHDA Läsion erhalten hatten, wurde, wie erwartet, mit  $96,26\% \pm 23,46\%$  unter Standardhaltung bzw.  $99,22\% \pm 16,27\%$  bei Haltung in reizreicher Umgebung mit physischer Aktivität keine wesentliche Seitendifferenz beobachtet. Das Ausmaß des nigralen Verlustes dopaminergener Neurone stimmte dabei gut

überein mit den Ergebnissen von Kirik und Mitarbeitern, die in aufwendigen Serienuntersuchungen verschiedene Arten von 6-OHDA-Läsionen hinsichtlich neurodegenerativer Veränderungen und Rotationsverhalten charakterisierten (Kirik et al., 1998).

#### **4.2.3 Der Proliferationsnachweis mittels BrdU**

Auf das Funktionsprinzip des Proliferationsnachweises mittels des Thymidinanalogs 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU) wurde bereits in den Kapiteln Einleitung sowie Material und Methoden eingegangen. Bei diesem Verfahren ist zu beachten, dass mehrere Fehlerquellen bei der Interpretation der Ergebnisse bestehen. Neben den in der S-Phase befindlichen Zellen nehmen auch Zellen, in denen DNA-Reparaturen oder apoptotische Prozesse ablaufen, BrdU auf (El-Khodor et al., 2003; Rakic, 2002). Dies wäre insbesondere für die 6-OHDA-lädierten Tiergruppen zu erwarten. Tatsächlich unterscheidet sich die proliferative Aktivität in der lädierten SN zum Zeitpunkt der Messung jedoch nicht signifikant von derjenigen der nicht lädierten Seite, sodass nicht davon auszugehen ist, dass die erhobene Anzahl der BrdU-positiven Zellen signifikant von diesem Störfaktor beeinflusst wurde.

Bei dieser Arbeit wurde eine BrdU-Konzentration von 50mg/kg KG verwendet. Es existieren jedoch auch Studien, die mit anderen, teilweise höheren Konzentrationen arbeiteten (Frielingsdorf et al., 2004; Zhao et al., 2002). Aufgrund der Toxizität und Mutagenität von BrdU ist es unmöglich, die Dosis dieser Substanz soweit zu erhöhen, dass alle Zellen markiert werden, sodass bedacht werden muss, dass lediglich eine Fraktion der in der S-Phase befindlichen Zellen mit BrdU markiert wird (Cameron & McKay, 2001; Morris, 1991). Daher ist spiegelt die in dieser Studie detektierte Anzahl proliferierender Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht die tatsächliche Zahl der proliferierenden Zellen wider, die vermutlich deutlich höher liegt. Allerdings betrifft dieser systematische, methodisch bedingte Fehler alle experimentellen Gruppen in gleicher Weise, sodass die Relationen zwischen den Gruppen erhalten bleiben und damit die prinzipiellen Aussagen dieser Studie ihre Gültigkeit behalten (Gould & Gross, 2002; Rakic, 2002). Des Weiteren wird diese Dosierungen von diversen Arbeitsgruppen für Versuche zur zerebralen Proliferation verwendet, sodass hier eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen dieser Studien besteht, was die Einordnung unserer Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext erleichtert (Bick-Sander et al., 2006; Kempermann et al., 1997; Steiner et al., 2004).

### **4.3 Bedeutung der in der adulten SN proliferierenden Zellen**

Unter allen Versuchs- und Kontrollbedingungen wurden in der SN dieselben neu gebildeten Zelltypen, definiert durch ihre Immunreaktivität für die verwendeten Marker,

beobachtet. Diese neu gebildeten Zellen exprimierten zum Großteil gliale Marker. Die Phänotypisierung ergab, dass NG2- exprimierende, zur Klasse der oligodendrozytären Vorläuferzellen (OPCs) gehörende, gliale Zellen unter allen Versuchsbedingungen den größten Anteil an den proliferierenden Zellen darstellten. Unter den verschiedenen Versuchs- und Kontrollbedingungen wurde allerdings eine unterschiedliche Verteilung dieser neu gebildeten Zelltypen beobachtet, deren mögliche Bedeutung in den folgenden Abschnitten diskutiert wird.

#### **4.3.1 Oligodendrozytäre Vorläuferzellen (OPCs)**

Die jeweils größte identifizierbare Fraktion BrdU- positiver Zellen in der adulten SN unter den verschiedenen Versuchsbedingungen war immunreaktiv für das Chondroitinsulfat-Proteoglykan NG2. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, die Proliferationsuntersuchungen in der SN durchführten (Lie et al., 2002; Yoshimi et al., 2005). Ferner können diese Zellen zeitlebens sowohl in neurogenen als auch in nicht neurogenen Arealen des Gehirns gefunden werden und stellen im adulten ZNS der Ratte die größte sich teilende Zellpopulation dar (Dawson et al., 2000 & 2003). Die Bedeutung NG2- positiver Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird diskutiert, dass NG2 exprimierende OPCs unter physiologischen Bedingungen an der Regulation der synaptischen Transmission beteiligt sind. Sie sind um synaptische Strukturen herum lokalisiert und besitzen Glutamatrezeptoren. Im Hippocampus wurden solche glutamatergen OPC-Neuron-Synapsen beschrieben, über die OPCs an der Modulation synaptischer Aktivitäten im Allgemeinen und der glutamatergen Transmission im Speziellen beteiligt sind (Dawson et al., 2003; Levine et al., 2001). In experimentellen Arbeiten, die pathophysiologische Aspekte untersuchten, wurde gezeigt, dass NG2- exprimierende Vorläuferzellen bei der Reaktion des ZNS auf traumatische oder ischämische Läsionen eine Rolle spielen und verstärkt post lesionem proliferieren (McTigue et al., 2001; Tanaka et al., 2001). Sie tragen somit zur Entstehung einer reaktiven Gliose bei. Es gibt Hinweise, dass das NG2-Proteoglykan involviert ist in die Bildung einer glialen Narbe und erfolgreiche axonale Regeneration verhindert (Tan et al., 2005 & 2006). Es wird gemeinhin angenommen, dass NG2 exprimierende Zellen eine Population oligodendrozytärer Vorläuferzellen (OPCs) repräsentieren, die sich zu Oligodendrozyten ausdifferenzieren kann (Nishiyama et al., 1999 & 2002). Es gibt Hinweise, dass OPCs die Stammzelleigenschaft der asymmetrischen Selbsterneuerung besitzen. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass diese NG2- positiven Zellen den bipotenten O2A- Progenitorzellen identisch sein könnten, die in vitro Typ-2- Astrozyten und reife Oligodendrozyten generieren können (Engel & Wolswijk, 1996; Jones et al., 2002; Levine et al., 1996; McTigue et al., 2001; Nishiyama et al., 1996 & 1999 & 2001; Raff et al., 1983). Seit kurzem gibt es zudem Hinweise, dass oligodendrozytäre

Vorläuferzellen (OPCs) neurogenes Potenzial besitzen und dass zumindest eine Subpopulation dieser NG2 exprimierenden Zellen unter speziellen Bedingungen in vitro und in vivo Neurone generieren kann. So wurde die Differenzierung zu GABA-ergen Interneuronen beschrieben (Aguirre et al., 2004; Belachew et al., 2003). Es besteht daher die Möglichkeit, dass zumindest eine Subpopulation NG2 exprimierender Zellen in manchen Gebieten des zentralen Nervensystems eine Klasse potenzieller neuronaler Vorläuferzellen repräsentiert. Für die SN wurde gezeigt, dass NG2 exprimierende Zellen nach Explantation aus der adulten SN und Zellkultur fähig waren, sowohl in vitro als auch in vivo nach Transplantation in den Gyrus dentatus Neurone zu generieren (Lie et al., 2002). In der nativen SN und nach Rücktransplantation von kultivierten NG2 exprimierenden Zellen in die SN wurde in derselben Arbeit jedoch keine neuronale Differenzierung beobachtet (Lie et al., 2002). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen dieser Studie, in der ebenfalls ein Großteil der proliferierenden Zellen NG2 exprimierte, darüber hinaus aber keine Neurogenese beobachtet wurde (zur Frage der Neurogenität der SN siehe 4.4).

#### **4.3.2 BrdU-positive GFAP exprimierende Zellen – Astrozyten mit neuronaler Vorläuferfunktion?**

GFAP exprimierende BrdU- positive Zellen stellten unter allen Versuchsbedingungen eine robust proliferierende Zellpopulation dar. Die Expression von GFAP wird allgemein assoziiert mit astrozytärer Differenzierung. Neben der Möglichkeit, dass es sich bei diesen Zellen um gewöhnliche proliferierende Astrozyten, also differenzierte Zellen der glialen Zelllinie, handelt, wird die Hypothese diskutiert, dass GFAP exprimierende Zellen eine Population neuronaler Vorläuferzellen darstellen. Es konnte nämlich für den Gyrus dentatus und die subventrikuläre Zone gezeigt werden, dass reife Neurone aus proliferierenden BrdU- positiven GFAP exprimierenden Zellen hervorgehen (Doetsch et al., 1999; Kempermann et al., 2004; Seri et al., 2001). Einer gängigen Hypothese zu Folge werden bei der hippocampalen Neurogenese im Gyrus dentatus drei Reifungsstadien (Zelltyp I-III) beobachtet, wobei die GFAP- positiven Zellen den Typ1-Stammzellen entsprechen. Sie koexprimieren den Vorläuferzellmarker Nestin und werden ihrer Morphologie wegen auch als Radialglia-ähnliche Stammzellen bezeichnet (Kempermann et al., 2004). Man geht davon aus, dass diese BrdU/Nestin/GFAP- positiven Zellen eine Subpopulation der von Seri beschriebenen BrdU/GFAP- positiven Zellen sind (Kempermann et al., 2004). Da bis jetzt keine Generierung neu gebildeter Neurone aus glialen Zellen in der SN beschrieben wurde und auch in dieser Studie keine nigrale Neurogenese gefunden wurde, ist die Funktion neu gebildeter GFAP- positiver Zellen in der adulten SN nicht geklärt und wahrscheinlich nicht identisch mit deren neurogener Funktion in Gyrus dentatus und subventrikulärer Zone. Unter anderem haben

die oben beschriebenen Transplantationsexperimente von Lie und Mitarbeitern (Lie et al., 2002) gezeigt, dass das Differenzierungspotenzial von Zellen ortsspezifisch ist, da die Mikroumgebung auf die zelluläre Differenzierung entscheidenden Einfluss hat. So unterliegen Neurogenese und Gliogenese wahrscheinlich je nach Hirnareal unterschiedlichen Regulationsmechanismen. Zur Klärung der Frage, ob BrdU/GFAP-positive nigrale Zellen eine Population von Vorläuferzellen mit neurogenem Potenzial darstellen, die nur durch lokale Faktoren in der SN inhibiert werden, wären Transplantationsexperimente analog denen von Lie et al. geeignet, die nach Explantation von BrdU/GFAP-positiven Zellen diese in den neurogenen Gyrus dentatus transplantieren und beobachten, ob dort eine Differenzierung zu Neuronen stattfindet bzw. Studien, die das Differenzierungsverhalten nach Rücktransplantation in die SN observieren.

### **4.3.3 Mikrogli**

Unter allen Versuchsbedingungen konnte eine robuste Population BrdU-positiver Iba-1 exprimierender Zellen detektiert werden. Das Iba-1 Protein ist ein kalziumbindendes Adaptermolekül mikroglialer Zellen, sodass die Kolo-kalisation von BrdU und Iba-1 proliferierende Mikrogliazellen spezifisch visualisiert. Unter keiner der Versuchsbedingungen, weder nach 6-OHDA-Läsion noch in reizreicher Umgebung und Lauftraining, kam es zu einer signifikanten Veränderung der Anzahl dieser Zellen. Mikrogliale Zellen sind als eine robust proliferierende Zellpopulation des ZNS bekannt. Insofern stimmen die Ergebnisse dieser Studie mit den bisherigen Erkenntnissen überein. Vor allem im Kortex von Nagetieren wurde ein hoher Anteil der Mikroglia an den proliferierenden Zellen beobachtet (Ehninger & Kempermann, 2003; Hommes & Leblond, 1967). Mikrogliazellen erfüllen in dem wegen fehlender Lymphe immunologisch benachteiligten Gehirn eine integrale immunologische Funktion. Ohne immunologische Stimulation befinden sich diese Zellen in einem Ruhezustand, über dessen Funktion und Bedeutung unter physiologischen Konditionen wenig bekannt ist. Es bestehen jedoch Mechanismen der mikroglialen-neuronalen Interaktion, über die die Mikroglia Einfluss auf neuronale Vorgänge nehmen kann, z.B. durch mikrogliale Sekretion neurotropher Faktoren (Fields & Stevens-Graham, 2002), sodass nicht auszuschließen ist, dass diese Zellpopulation auch bei neuronalen und glialen Proliferations- und Differenzierungsvorgängen von Bedeutung ist.

### **4.3.4 Nicht identifizierte Zellen**

Ein wesentlicher Teil BrdU-positiver Zellen in der nativen SN zeigte keine Immunreaktivität für die verwendeten reifen und unreifen neuronalen (TH, NeuN, DXC), astrozytären (GFAP), oligodendrozytären (CNPase) und mikroglialen (Iba-1) Marker.

Nach 6-OHDA-Läsion sowohl unter Standardbedingungen als auch bei reizreicher Umgebung und Lauftraining konnte ein beträchtlicher Teil der BrdU- positiven Zellen nicht identifiziert werden. Zu diesem Ergebnis kommen auch Kay und Blum, die das MPTP-Modell der Maus verwendeten (Kay & Blum, 2000). Diese Beobachtung wirft die Frage nach der Identität und dem Expressionsmuster dieser nach 6-OHDA-Läsion proliferierenden Zellen auf, die vorerst unbeantwortet bleibt. Es wäre denkbar, dass diese Zellen eine Zellpopulation in einem Entwicklungsstadium repräsentieren, in dem gewöhnliche Antigeneigenschaften (noch) nicht vorliegen und gängige Marker (noch) nicht exprimiert werden. Dies wäre für Subpopulationen neuraler Progenitorzellen in spezifischen Reifungs- oder Ruhestadien denkbar. Außerdem wäre es möglich, dass diese Zellen Marker exprimieren, die nicht von uns zur Phänotypisierung verwendet wurden, oder die noch unbekannt sind.

Des Weiteren wurde im Zuge der konfokalen Phänotypisierung keine Kolokalisation von BrdU mit den Markern DXC, NeuN, TH und CNPase gefunden. Während dieser Befund bezüglich der drei erstgenannten Marker im folgenden Abschnitt diskutiert werden soll, wird hier auf die fehlende Kolokalisation von CNPase mit BrdU eingegangen. Die Abwesenheit von CNPase- Immunreaktivität in proliferierenden Zellen legt nahe, dass in der SN unter den von uns verwendeten Versuchsbedingungen keine proliferierenden Oligodendrozyten vorkamen. Die hier vorliegende Studie war die erste, die in der adulten SN proliferierende Zellen auf CNPase Kolokalisation untersuchte. Lie et al. fanden nach 4 Wochen nach BrdU – Applikation einen Anteil von 14% reifer BrdU- positiver Oligodendrozyten, identifiziert anhand ihrer APC Immunreaktivität (Lie et al., 2002). Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten neben der Verwendung unterschiedlicher oligodendrozytärer Marker durch die verschiedenen Beobachtungszeitpunkte erklärbar sein. Daten von Dawson und Mitarbeitern besagen, dass erst sechs Tage nach Ende ihrer BrdU- Applikationsphase eine messbare BrdU/CNPase-Kolokalisation beobachtet werden konnte (Vergleiche Dawson et al., 2003). Dieser Zeitverlauf der BrdU/CNPase-Kolokalisation ist geeignet, das negative Ergebnis unserer Studie diesbezüglich zu erklären, da hier die histologische Untersuchung direkt im Anschluss an die BrdU- Applikation erfolgte. Auch Ehninger und Kempermann, die verschiedene nicht neurogene kortikale Regionen auf proliferierende Gliazellen untersuchten, fanden lediglich vereinzelte BrdU/CNPase- positive Zellen (Ehninger & Kempermann, 2003), was darauf schließen lässt, dass es sich bei diesen Zellen nicht um eine wesentliche proliferierende Zellpopulation handelt.

#### **4.4 Die adulte Substantia nigra – eine neurogene Region?**

Die Frage, ob in der adulten SN neue Neurone generiert werden, wird zurzeit kontrovers diskutiert ebenso wie die Frage, ob diese eventuell vorhandene Neurogenese in

Tiermodellen des PS degenerierte dopaminerge Neurone ersetzen kann (Chen et al., 2005; Cooper et al., 2004; Frielingsdorf et al., 2004; Kay & Blum, 2000; Lie et al., 2002; Mohapel et al., 2005; Steiner et al., 2006; Yoshimi et al., 2005; Zhao et al., 2003). Zur Klärung dieser Fragen führten wir eine konfokale Phänotypisierung der BrdU-positiven Zellen der SN durch. Wir fanden keine Kolokalisation von BrdU mit dem immaturren neuronalen Marker DCX, dem maturaen neuronalen Marker NeuN oder dem dopaminerg neuronalen Marker TH. Es wurden somit unter keiner experimentellen Bedingung BrdU-positiv neuronale Phänotypen beobachtet. Ferner sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob reizreiche Umgebung und physische Aktivität, also Stimuli, von denen bekannt ist, dass sie im Gyrus dentatus sowohl die Gliogenese als auch die Neurogenese signifikant steigern, geeignet sind, die Genese von Neuronen in der SN zu induzieren. Diese Arbeit konnte zeigen, dass es bei Haltung von nativen und 6-OHDA-lädierten Tieren in reizreicher Umgebung mit Lauftraining nicht zu einer neuronalen Differenzierung BrdU-positiver Zellen kommt. Diese Tatsache legt nahe, dass reizreiche Umgebung mit Lauftraining als neurogene Stimuli nicht ausreichen, um in der adulten SN Neurone zu generieren oder die Reifung von neuen Neuronen aus mutmaßlichen Vorläuferzellen zu induzieren und unterstützt die damit Gültigkeit des Konzeptes der ortsspezifischen Neuropermissivität.

Unsere Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit denen anderer Arbeitsgruppen, die in ihren Untersuchungen ebenfalls keine adulte Neurogenese in der SN, weder bei nativen Mäusen noch nach 6-OHDA-Läsion, MPTP-Läsion oder intrastriatarer Infusion von GDNF, BDNF oder PDGF detektierten (Chen et al., 2005; Cooper et al., 2004; Frielingsdorf et al., 2004; Kay & Blum, 2000; Lie et al., 2002; Mohapel et al., 2005; Steiner et al., 2006). Im Gegensatz dazu gibt es zwei Arbeiten, die von in der adulten SN der Maus neu gebildeten Neuronen berichten. Die Proliferation dieser Neurone soll ferner durch MPTP-Läsion des dopaminergen Systems stimuliert werden (Shan et al., 2006; Zhao et al., 2003). Es wurden von den selben Arbeitsgruppen ferner Daten publiziert, die für das Vorkommen von neugebildeten dopaminergen Neuronen in der adulten SN sprechen (Shan et al., 2006; Zhao et al., 2003). Diese entscheidenden Diskrepanzen in den Befunden könnten erklärbar sein durch die Tatsache, dass unterschiedliche Verfahren zur Detektion proliferativer Prozesse verwendet wurden und die BrdU-Markierung den bereits in Abschnitt 4.2.3 diskutierten Fehlermöglichkeiten unterliegt und beispielsweise abhängig ist von Dosis, Applikationsdauer und -zeitpunkt. Ferner ist die sichere Kolokalisation von BrdU mit TH in einer Zelle nicht beweisend für das Vorliegen von dopaminerg Neurogenese, da nukleäre BrdU-Inkorporation wie in der Einleitung beschrieben, außer bei Proliferation auch bei DNA-Reparatur, Apoptose, Atrophie und Degeneration, wie etwa im Falle von 6-OHDA-Läsion, vorkommen kann (Rakic, 2002). Andererseits ist das Fehlen einer sicheren Kolokalisation von BrdU und TH in einer

Zelle nicht beweisend für die Abwesenheit von dopaminergem Neurogenese, denn dopaminerge Neurone könnten sich aus Vorläuferzellen differenzieren, die sich im untersuchten Zeitraum in einem nicht- proliferativen Stadium befinden. Ferner könnten geringe Ausmaße der Neurogenese dem BrdU- Nachweis entgehen, da nicht alle sich teilenden Zellen aufgrund der kurzen Bioverfügbarkeit mit BrdU markiert werden und die immunhistochemischen Nachweismethoden nicht 100%-ig sensitiv sind (Gould & Gross, 2002; Rakic, 2002).

Auch mittels Proliferationsnachweis durch retrovirale Transduktion von grünem fluoreszierendem Protein (GFP) in duplizierende Chromosomen konnten bisher keine proliferierenden TH- positiven Zellen in der adulten SN gefunden werden weder nativ noch nach MPTP- Läsion (Yoshimi et al., 2005). Der eben vorgetragenen Argumentationslinie folgend, berichten die Autoren aber trotz des fehlenden Proliferationsnachweises von der prinzipiellen Möglichkeit einer kompensatorischen postläsionalen dopaminergen Differenzierung von mitotisch stillen Vorläuferzellen, dargestellt durch den Nachweis BrdU- negativer aber PSA-NCAM/TH- positiver Zellen. [PSA-NCAM, polysialisiertes neuronales Zelladhäsionsmolekül, soll ein spezifischer Marker für unreife Neurone zumindest des Hippocampus sein (Fukuda et al., 2003; Kuhn et al., 1996; Seki & Arai, 1993)].

Ein weiterer beachtenswerter Punkt zur Erklärung der sich widersprechenden Ergebnisse bezüglich adulter nigraler Neurogenese ist die Tatsache, dass mit dem MPTP- und dem 6-OHDA-Modell verschiedene Modelle des PS verwendet wurden. Als weitere Fehlerquelle kommt die konfokalmikroskopische Auswertung in Betracht, bei der nur durch die Anwendung strikter Kriterien und gründlicher Untersuchung in verschiedenen Zellebenen der z-Achse vermieden werden kann, die räumliche Nähe von Markern unterschiedlicher Zellen als Doppelmarkierung einer Zelle misszudeuten.

Abschließend ist daher festzustellen, dass Neuropermissivität und Neurogenität der SN, obwohl nach Einschätzung der meisten sich damit befassenden Wissenschaftler und Bewertung der aktuellen Literatur derzeit unwahrscheinlich, zurzeit nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Daher bedarf es weiterer Experimente, um diesen wichtigen Sachverhalt zu klären.

#### **4.5 Auswirkungen der 6-OHDA-Läsion auf die nigrale zelluläre Neurogenese**

Nachdem in den vorherigen Abschnitten die prinzipielle Bedeutung der in der SN proliferierenden Zellen und die Frage der nigralen Neurogenität diskutiert wurde, werden im Folgenden die Veränderungen der Zellproliferation und –differenzierung nach 6-OHDA-Läsion und deren Implikationen erörtert.

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, hat Dopamin eine regulatorische Wirkung auf

Proliferation und Differenzierung im ZNS, die allerdings von den einzelnen Regionen des ZNS, dem Stadium der Zellreife, der Dosierung und den experimentellen Bedingungen abhängig zu sein scheint. Im neurogenen und gliogenen Gyrus dentatus wurde für Dopamin eine Schlüsselrolle bei der Generierung neuer Neurone postuliert (Höglinger et al., 2004), da Dopamindepletion zu einer signifikanten Reduktion der hippocampalen Neurogenese führte. Es ist anzunehmen, dass sich die Mechanismen der zellulären Plastizität in neurogenen Zonen des ZNS unterscheiden von Zonen, in denen wahrscheinlich keine Neurogenese stattfindet, wie der SN. Zur Klärung der Rolle von Dopamin für die nigrale zelluläre Plastizität führten wir daher Untersuchungen an nativen Ratten und im Tiermodell der 6-OHDA- induzierten nigrostriatalen Dopamindepletion für das PS durch.

Um die Auswirkungen von reizreicher Umgebung und Lauftraining auf die Plastizität der 6-OHDA-lädierten SN einordnen zu können, war es zunächst notwendig, die Effekte der 6-OHDA- Läsion auf die zelluläre Plastizität der SN von Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden, zu untersuchen. Verschiedene Studien zeigten für diverse Hirnareale, dass es nach unterschiedlichsten Läsionen zu reaktiven Reparaturmechanismen kommt, die mit gesteigerter zellulärer Plastizität einhergehen (siehe auch 1.3.2). Ziel dieser Teilstudie war die Charakterisierung der Veränderungen der zellulären Plastizität der adulten SN, die durch 6-OHDA-Läsion induziert werden.

#### **4.5.1 Auswirkungen der 6-OHDA-Läsion auf die nigrale Zellproliferation**

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die 6-OHDA-Läsion der SN nicht die nigrale Zellproliferation als Ganzes beeinflusst, denn die Anzahl BrdU- positiver Zellen veränderte sich nicht statistisch signifikant. Kay und Blum beobachteten im MPTP-Modell der Maus dagegen eine nigrale Proliferationssteigerung anhand erhöhter Zahlen BrdU- positiver Zellen in lädierten Mäusen im Vergleich zu nicht lädierten Tieren (Kay & Blum, 2000). Allerdings war diese Proliferationssteigerung lediglich transientser Natur und bereits am 15. Tag post lesionem nicht mehr nachweisbar. Dieser kurzfristige Zeitverlauf läsionsinduzierter Proliferation wäre geeignet, unsere Beobachtung einer nicht signifikant veränderten BrdU- Reaktivität vier Wochen post lesionem zu erklären.

Eine weitere interessante Tatsache ist die Beobachtung, dass ähnliche Zahlen BrdU- positiver Zellen sowohl ipsilateral als auch kontralateral zur Läsion gezählt wurden, was den Schluss zulässt, dass die unilaterale toxische Schädigung der SN nicht zu einer einseitigen Proliferationsänderung führte, die nach vier Wochen noch nachweisbar gewesen wäre. Ein andauernder toxinvermittelter Proliferationseffekt ist damit ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu beobachteten Lie et al. in einer Teilstudie ihrer allerdings auf mögliche nigrale Neurogenese fokussierten Arbeit nach 6-OHDA-Läsion deskriptiv erhöhte Zahlen von BrdU- positiven Zellen auf der lädierten Seite (Lie et al.,

2002). Aus ihrer Veröffentlichung gehen jedoch nicht die zeitlichen Abstände zwischen 6-OHDA-Läsion, BrdU-Applikation und Tötung der Tiere mit histologischer Aufarbeitung hervor. Ferner räumten sie ein, dass sie die BrdU-positiven Zellen nicht quantifizieren konnten, da es ihnen nach Untergang der dopaminergen Neurone nicht möglich war, das Gebiet der SN abzugrenzen. Bei unserer Aufarbeitung legten wir bereits beim Schneiden Wert auf die sorgfältige Ausrichtung des Gehirnes auf anatomische Leitstrukturen, wie gleichzeitiger anteriorer Beginn des Striatums, gleichmäßig sichtbare Commissura anterior und Grenzen des STN. So konnte erreicht werden, dass auf den Schnitten rechte und linke Hirnhälfte identische bis sehr ähnliche antero-posteriore Koordinaten aufwiesen, sodass die Orientierung durch Vergleich mit der kontralateralen nicht lädierten Seite möglich war. Zudem ist es möglich, sich auch ohne TH-Immunreaktivität anhand von charakteristischen Faserverläufen und nachbarschaftlichen Strukturen zu orientieren und die Grenzen der SN sicher zu identifizieren. So ist der lediglich qualitative Eindruck von Lie et al. unserer quantitativen, stereologischen Analyse methodisch unterlegen (Lie et al., 2002; Steiner et al., 2006). Wie oben bereits ausgeführt, sprechen die Daten von Kay und Blum für eine transiente Proliferationssteigerung, die bereits zwei Wochen post lesionem nicht mehr detektierbar ist (Kay & Blum, 2000). Somit wäre unsere Beobachtung einer praktisch identischen nigralen BrdU-Immunreaktivität ipsi- und kontralateral dadurch erklärbar, dass die proliferativen Prozesse aufgrund ihrer transienten Natur nach vier Wochen nicht mehr nachweisbar sind.

#### **4.5.2 Auswirkungen der 6-OHDA-Läsion auf die Differenzierung proliferierender Zellen in der adulten SN**

Trotz nicht signifikant veränderter globaler Zellproliferation, gemessen anhand der Anzahl BrdU-positiver Zellen, war eine selektive Beeinflussung der Proliferation einzelner Subpopulationen durch die 6-OHDA-Läsion feststellbar. So reagierten neu gebildete GFAP-exprimierende und NG2-exprimierende Zellen unterschiedlich auf die 6-OHDA-Läsion.

##### *4.5.2.1 NG2 exprimierende proliferierende Zellen*

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zu keiner signifikanten Änderung der Anzahl BrdU/NG2-exprimierender Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren vier Wochen nach 6-OHDA-Läsion kommt. Diese Information ist wichtig, da proliferierende NG2-exprimierende Zellen, wie bereits erörtert (siehe 4.3.1), Stammzeleigenschaften und prinzipiell neurogenes Potenzial besitzen (Lie et al., 2002). Eine Erhöhung dieser Zellzahl post lesionem hätte daher auf die Induktion kompensatorischer neurogener Mechanismen durch die 6-OHDA-Läsion in der SN hingewiesen.

In der aktuellen Literatur wird die Bedeutung von NG2 exprimierenden Zellen bei der Induktion von Gliosen diskutiert (Tan et al., 2006). So wurde in verschiedenen Läsionsmodellen eine verstärkte Proliferation NG2 exprimierender Zellen beobachtet (McTigue et al., 2001; Tanaka et al., 2001). Die Tatsache, dass in dem von uns verwendeten 6-OHDA-Modell keine Steigerung der Anzahl BrdU/NG2 positiver Zellen beobachtet wurde, könnte erklärbar sein durch den andersartigen pathophysiologischen Stimulus unseres Modelles. Ferner wäre es möglich, dass es post lesionem zu einem transienten, reaktiven Anstieg BrdU/NG2 exprimierender Zellen kommt, der unserem Nachweis nach vier Wochen entgangen wäre. Eine solche kurzfristige, transiente Kinetik der postläsionellen Proliferation NG2 exprimierender Zellen konnte in verschiedenen Läsionsmodellen gezeigt werden (Levine et al., 1994; McTigue et al., 2001). Das Schicksal dieser transient nachweisbaren Zellen ist bis jetzt unbekannt und könnte Zelltod, Exmigration und Differenzierung in andere Zelltypen beinhalten (Levine et al., 2001). Als wichtige Erkenntnis dieser Teilstudie steht jedoch - vorbehaltlich einer möglichen transienten Proliferationssteigerung - abschließend die Tatsache, dass die 6-OHDA-Läsion alleine nicht zu einer dauerhaften Erhöhung der Anzahl proliferierender NG2 exprimierender, potenziell neurogener Zellen führt.

#### 4.5.2.2 *GFAP exprimierende proliferierende Zellen*

Nach 6-OHDA-bedingter Dopamindepletion wurde eine signifikante Reduktion von neugebildeten GFAP-positiven nigralen Zellen beobachtet. Höglinger und Mitarbeiter beschrieben eine Proliferationsreduktion nach 6-OHDA-induzierter Dopamindepletion für die subependymale Zone (Höglinger et al., 2004). Die Ergebnisse beider Arbeiten weisen somit auf eine mögliche Bedeutung von Dopamin als entscheidenden Faktor bei der Regulation der zellulären Plastizität im ZNS hin.

In der 6-OHDA-lädierten SN wurde die Entstehung einer Gliose beschrieben, die mit einer transienten intensiven Erhöhung der Immunreaktivität für GFAP einhergeht (Gomide et al., 2005). Allerdings führten diese Autoren keine Proliferationsdetektion durch, sodass die Frage ob es sich dabei um neu gebildete Zellen handelt, unbeantwortet blieb. Andere Erklärungsmöglichkeiten dieser beobachteten verstärkten GFAP-Immunreaktivität wären die Immigration von Astrozyten aus anderen Hirnarealen oder aber die läsionsbedingte Hochregulation der GFAP-Expression von autochtonen nigralen Astrozyten (Kay & Blum, 2000). Der signifikante Rückgang der BrdU/GFAP-positiven Zellen in unserer Studie lässt vermuten, dass bei der Bildung der 6-OHDA-läsionsinduzierten Gliose in der SN die Neogenese von Astrozyten eine untergeordnete Rolle spielt. Im MPTP-Modell der Maus für nigrostriatale Degeneration wurde gezeigt, dass im Striatum ein Großteil der BrdU-positiven Zellen post lesionem GFAP exprimiert (Kay & Blum, 2000). Die Autoren folgerten logischerweise, dass diese proliferierenden

Zellen als reaktive Astrozyten an der Entstehung der läsionsinduzierten striatalen Gliose beteiligt sind. In der SN konnten dieselben Autoren jedoch innerhalb des von ihnen beobachteten Zeitraums von 14 Tagen keine BrdU- positiven GFAP exprimierenden Zellen detektieren, obwohl auch dort reaktive Astroglia eine Gliose induziert (Gomide et al., 2005; Kay & Blum, 2000). Sie folgerten daher, dass die MPTP- induzierte Gliose in der SN nicht durch die Neogenese von Astrozyten zustande kommt, was sich prinzipiell auch mit unserem Ergebnis einer post 6-OHDA-lesionem reduzierten Anzahl BrdU/GFAP- positiver Zellen deckt. Diese Daten stützen die Vermutung, dass bei der Entstehung der nigralen läsionsinduzierten Gliose in der Hauptsache bereits präexistente Astrozyten involviert sind. Die Tatsache, dass wir jedoch im Gegensatz zu Kay und Blum BrdU/GFAP- positive Zellen gefunden haben, könnte zum einen auf die unterschiedlichen verwendeten Tiermodelle zurückzuführen sein oder aber auf unseren späteren Beobachtungszeitpunkt. Es ist also anzunehmen, dass die Regulation der Genese von Astrozyten in unterschiedlichen Arealen des ZNS und in verschiedenen Läsionsmodellen unterschiedlichen Mechanismen unterliegt und definierten Zeitverläufen folgt.

#### **4.6 Auswirkungen von reizreicher Umgebung und Lauftraining auf die zelluläre Neogenese in der adulten SN**

In dieser Studie wurden erstmalig die Auswirkungen von reizreicher Umgebung und physischer Aktivität auf die nigrale zelluläre Neogenese untersucht, um zu klären, inwiefern die SN unter stimulierenden Bedingungen zu zellulärer Plastizität fähig ist. Diese Frage ist von besonderer klinischer Relevanz, denn die Stimulation zellulärer Plastizität in der SN durch reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität könnte das klinische Outcome von Patienten mit PS verbessern.

##### **4.6.1 Auswirkungen von reizreicher Umgebung und Lauftraining auf die Zellproliferation in der adulten SN**

In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg der zellulären Proliferation in der adulten SN, gemessen anhand der Anzahl BrdU immunreaktiver Zellen, bei Haltung in reizreicher Umgebung mit täglichem Lauftraining nachgewiesen werden. Diese Proliferationssteigerung wurde sowohl bei nativen als auch bei 6-OHDA-lädierten Tieren beobachtet. Damit ist der Nachweis erbracht, dass in der SN, einer Region, die als nicht neurogen angesehen wird, physiologische Stimuli der Neurogenese zu einer Verstärkung der zellulären Proliferation und Gliogenese führen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die bei Tierhaltung in reizreicher Umgebung sowie körperlicher Aktivität Proliferationssteigerungen in verschiedenen Hirnregionen wie etwa Hippocampus, subventrikulärer Zone und kortikalen Arealen beobachteten

(Ehninger & Kempermann, 2003; Kempermann et al., 1997; Li et al., 2005; Steiner et al., 2004; Van Praag et al., 1999). Das beobachtete Phänomen der Modulierbarkeit der nigralen zellulären Neogenese ist von zentraler Bedeutung für das Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge in der SN. Auf ein mögliches funktionelles Korrelat der gesteigerten zellulären Neogenese in Form einer Reduktion des amphetaminreduzierten Rotationsverhaltens 6-OHDA lädierter Tiere, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden, soll im später eingegangen werden (siehe 4.7). Um die Proliferationsänderungen weiter einordnen zu können, war es erforderlich, die Identität dieser Zellen mittels immunhistochemischer Phänotypisierung zu klären.

#### **4.6.2 Auswirkungen von reizreicher Umgebung und Lauftraining auf die Zelldifferenzierung in der adulten SN**

Bei gesteigerter totaler nigraler Zellproliferation reagierten neu gebildete NG2 exprimierende und GFAP exprimierende Zellen unterschiedlich auf reizreiche Umgebung und Lauftraining. Es wurde eine signifikante Steigerung der Anzahl proliferierender NG2 exprimierender Zellen sowie deskriptiv eine Steigerung GFAP exprimierender Zellen in 6-OHDA lädierten Tieren beobachtet.

##### *4.6.2.1 NG2 exprimierende Zellen*

Wir beobachteten, dass reizreiche Umgebung und physische Aktivität in unserem Versuchsaufbau zu einer verstärkten Proliferation NG2- exprimierender Zellen führte, wobei dieses Phänomen interessanter Weise lediglich bei 6-OHDA lädierten Tieren statistische Signifikanz erreichte.

Nach alleiniger 6-OHDA-Läsion wurde, wie oben beschrieben, keine wesentliche Proliferationsänderung der NG2 exprimierenden Zellen beobachtet, sodass davon auszugehen ist, dass die 6-OHDA induzierte Degeneration nigraler Neurone keinen starken, zumindest keinen anhaltenden starken, Reiz für die nigrale zelluläre Proliferation insgesamt und die NG2 exprimierenden OPCs darstellt. Es wäre aber denkbar, dass hier ein additiver Effekt von reizreicher Umgebung und physischer Aktivität und einer oben diskutierten transienten Proliferationssteigerung nach 6-OHDA-Läsion vorliegt und für den Effekt einer lang anhaltenden, robusten und statistisch signifikanten Steigerung der zellulären Proliferation im Allgemeinen und der Proliferation von NG2 exprimierenden OPCs im Speziellen verantwortlich ist. Ein weiterer Erklärungsansatz für die bei reizreicher Umgebung und physischer Aktivität beobachtete signifikante Proliferationssteigerung NG2 exprimierender OPCs bei 6-OHDA lädierten Tieren wäre die Tatsache, dass OPCs regulatorisch und modulierend in die neuronale Transmission eingreifen. Es wird daher vermutet, dass sie auf Änderungen der elektrischen Aktivität mit Proliferation reagieren können (Dawson et al., 2003). So wurde gezeigt, dass OPCs

in direkter Nachbarschaft des synaptischen Spaltes lokalisiert sind und verschiedene Neurotransmitterrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, was impliziert, dass NG2 exprimierende OPCs strukturell und funktionell in der Lage sind, Änderungen der neuronalen Aktivität zu perzipieren und darauf zu reagieren (Bergles et al., 2000). Über diesen Mechanismus könnten in der SN NG2 exprimierende Zellen Änderungen der neuronalen Transmission, wie sie beispielsweise bei physischer Aktivität in einer lädierten SN entstehen könnten, perzipieren und als Proliferationsreiz verstehen. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass zur Zeit keine Untersuchungen über Art, Umfang und Funktion von Neuron-OPC-Interaktionen in der SN vorliegen. Hier sind weiterführende Studien notwendig, um die funktionelle Bedeutung der Population der NG2 exprimierenden OPCs in der SN im physiologischen und pathophysiologischen Kontext weiter zu charakterisieren.

Die Bedeutung des in dieser Studie erhobenen Befundes einer signifikanten Proliferationssteigerung der NG2 exprimierenden OPCs durch reizreiche Umgebung und physische Aktivität wird unterstrichen durch die Erkenntnis, dass diese Zellen, wie bereits diskutiert (siehe 4.3.1), die Stammzeleigenschaft der asymmetrischen Selbsterneuerung besitzen und potenziell in der Lage sind, unter speziellen Bedingungen Neurone zu generieren (Aguirre et al., 2004; Belachew et al., 2003). So zeigten Lie und Mitarbeiter in Transplantationsexperimenten, dass auch nigrale NG2 exprimierende OPCs neurogenes Potenzial besitzen, wobei in der wahrscheinlich nicht neurogenen SN dieses Differenzierungspotenzial nicht ausgeschöpft wird (Lie et al., 2002). Dementsprechend könnte man spekulieren, dass zumindest eine Subpopulation der nigralen NG2 exprimierenden OPCs eine potenzielle neurogene Vorläuferzellpopulation repräsentiert. Unter dieser spekulativen Annahme erscheint es ferner möglich, dass physiologische Stimuli, wie reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität, die in neurogenen Regionen zu einer Verstärkung der Neurogenese führen, in nicht neurogenen Regionen zur Proliferation von potenziellen neurogenen Vorläuferzellen führen. Somit würde durch reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität überall im ZNS das Potenzial der Plastizität erweitert, das jedoch nur in bestimmten Regionen für die Generierung von Neuronen ausreicht.

Abschließend ist zu sagen, dass NG2 exprimierende OPCs neben Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia heute als vierte wesentliche gliale Zellpopulation betrachtet werden sollten (Levine et al., 2001). Ihre Bedeutung wird durch ihr neurogenes Potenzial unterstrichen und durch die Tatsache, dass sie ubiquitär im ZNS proliferierend anzutreffen sind. Die Tatsache, dass sie auf verschiedene physiologische und pathophysiologische Reize mit starken Proliferationssteigerungen reagieren, lässt vermuten, dass sie weitere, bisher unbekannte Funktionen erfüllen, die in Zusammenhang mit neuroprotektiven, neurogenen und neuroreparativen Mechanismen stehen könnten

(Levine et al., 2001). Der in dieser Studie erbrachte Nachweis der Proliferationssteigerung dieser potenziell neurogenen NG2 exprimierenden Zellen durch physiologische Stimuli sollte Anlass geben, die Funktionen dieser Zellen und deren potenzielle therapeutische Nutzbarkeit weiter zu erforschen.

#### 4.6.2.2 GFAP exprimierende Zellen

Sowohl bei 6-OHDA lädierten als auch bei nicht lädierten Tieren war die Anzahl GFAP exprimierender Zellen in reizreicher Umgebung mit Lauftraining deskriptiv, statistisch jedoch nicht signifikant, erhöht. Da, wie oben beschrieben, die 6-OHDA-Läsion neu gebildete GFAP-positive Zellen signifikant reduziert, könnten reizreiche Umgebung und Lauftraining zumindest teilweise über die Induktion zellulärer Plastizität oder über die Ausübung protektiver Effekte den Zellverlust kompensieren. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass körperliche Aktivität und reizreiche Umgebung neben einer Proliferationssteigerung und Differenzierungsinduktion auch solche protektiven Effekte ausüben können (Carro et al., 2001; Cohen et al., 2003; Steiner et al., 2006; Young et al., 1999). So wurde für reizreiche Umgebung neben einer Neurogenesesteigerung auch nachgewiesen, dass sie zu einer Reduktion von apoptotischem Zelltod führt, den kainatinduzierten, exzitotoxischen Zelluntergang reduziert und Expression und Phosphorylierungszustand von Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren verändert (Young et al., 1999). Für physische Aktivität wurde, unter anderem im 6-OHDA-Modell nachgewiesen, dass sie zu einer Konzentrationssteigerung von neurotrophen Faktoren, wie GDNF und IGF1 führt, die als potente Wachstumsfaktoren, auch für dopaminerge Neurone, angesehen werden (Carro et al., 2001; Cohen et al., 2003).

Die Bedeutung des Befundes einer durch reizreiche Umgebung und physische Aktivität tendenziell gesteigerten Gliogenese GFAP exprimierender Zellen wird unterstrichen durch eine Vielzahl von Beobachtungen zur Funktion dieser Zellen. Seit Längerem ist bekannt, dass sich die Rolle GFAP exprimierender astrozytärer Zellen nicht auf die traditionell angenommene gewebliche Stützfunktion beschränkt, sondern dass vielfältige Möglichkeiten der Neuron-Glia-Interaktion bestehen, über die GFAP exprimierende Zellen auf die neuronale Aktivität Einfluss nehmen können (Übersicht: Volterra & Meldolesi, 2005). Einzelne mögliche Mechanismen werden im Kontext der funktionellen Verhaltensergebnisse diskutiert (siehe 4.7).

Zusätzlich gewinnt der Befund an Bedeutung durch die Tatsache, dass diese neu gebildeten GFAP exprimierenden Zellen in Zusammenhang mit adulter Neurogenese stehen könnten. Wie bereits ausführlich diskutiert (siehe 4.3.2), ist für zumindest für eine Subpopulation dieser Zellen Stammzeleigenschaften belegt und es wurde gezeigt, dass aus BrdU/GFAP immunreaktiven Zellen *in vivo* reife Neurone hervorgehen können (Doetsch et al., 1999; Kempermann et al., 2004; Seri et al., 2001). Die in dieser Studie

gewonnene Erkenntnis, dass reizreiche Umgebung und Lauftraining die 6-OHDA bedingte Reduktion von proliferierenden GFAP exprimierenden Zellen zumindest teilweise antagonisieren können, lässt mutmaßen, dass es auch in der pathologisch veränderten SN durch physiologische Stimuli zu einer Aktivierung der zellulären Plastizität mit verstärkter Proliferation potenziell neurogener Zellen kommt. Dass wir keine neu aufgetretene neuronale Differenzierung beobachtet haben konnten, stützt die Hypothese, dass zwar durch reizreiche Umgebung und physische Aktivität überall im ZNS plastisches Potenzial aktiviert wird, dieses jedoch nur in bestimmten Regionen für Neurogeneseinduktion ausreicht. Weiterführende Studien sollten sich daher verstärkt der genaueren Charakterisierung GFAP exprimierender Zellen in der SN als einer robust proliferierenden Zellpopulation mit putativem neurogenem Potenzial widmen.

#### **4.7 Auswirkungen von reizreicher Umgebung und Lauftraining auf das amphetamininduzierte Rotationsverhalten und die TH Expression der 6-OHDA-lädierten Tiere**

Um die Frage zu klären, ob die durch reizreiche Umgebung und Lauftraining induzierte zelluläre Plastizität funktionelle Auswirkungen auf das motorische Verhalten der 6-OHDA-lädierten Versuchstiere hatte, wurde die Untersuchung des amphetamininduzierten Rotationsverhaltens durchgeführt, welches ein gut charakterisiertes Verhaltensmodell für die funktionelle Evaluierung des nigrostriatalen Systems nach unilateraler 6-OHDA-Läsion ist (Kupsch et al., 1991; Ungerstedt, 1968). Die Untersuchung erfolgte am Tag des Versuchsendes, um einen Einfluss von Stress und Amphetamin auf die zelluläre Plastizität auszuschließen.

Die durchgeführte unilaterale, intrastriatale 4-Punktläsion induzierte, wie erwartet, ein signifikantes Rotationsverhalten bei Haltung unter Standardbedingungen sowie bei Haltung in reizreicher Umgebung mit physischer Aktivität, während nicht lädierte Tiere kein signifikantes Rotationsverhalten nach Amphetaminapplikation zeigten. Dabei entsprachen die gemessenen Rotationsanzahlen der 6-OHDA-lädierten Tiere den Ergebnissen von Kirik et al., die unter anderem eine histologische Charakterisierung der unilateralen intrastriatalen 6-OHDA-4-Punktläsion hinsichtlich des Rotationsverhaltens durchführten (Kirik et al., 1998).

Nach vier Wochen ergaben sich somit keine signifikanten Differenzen im amphetamininduzierten Rotationsverhalten von Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden im Vergleich zu Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden. Die durch 6-OHDA-Läsion und durch die Haltungsbedingungen in reizreicher Umgebung und Lauftraining induzierten zellulären Veränderungen führten folglich nicht zu einer Attenuierung 6-OHDA-läsionsbedingter funktioneller Defizite der Versuchstiere im amphetamininduzierten Rotationstest. Dies steht in Übereinstimmung

mit der Beobachtung einer nicht signifikant veränderten globalen Zellproliferation gemessen anhand der BrdU immunreaktiven Zellen in der SN bei 6-OHDA-Läsion. An dieser Stelle soll kurz auf eine Folgestudie unseres Labors verwiesen werden, bei der identische Versuche über einen Beobachtungszeitraum von sieben Wochen durchgeführt wurden. Hierbei zeigten sieben Wochen post lesionem die 6-OHDA-lädierten Tiere, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden, einen Trend, der allerdings keine statistische Signifikanz erreichte, zu weniger Rotationen als 6-OHDA-lädierte Tiere, die unter Standardbedingungen gehalten wurden. Ferner zeigten 6-OHDA-lädierte Tiere, die sieben Wochen in reizreicher Umgebung und mit Lauftraining gehalten wurden signifikant weniger Rotationen als 6-OHDA-lädierte Tiere, die vier Wochen unter identischen Bedingungen gehalten wurden (Abb. 16). Somit führte Langzeitstimulation durch reizreiche Umgebung und Lauftraining zu einer signifikanten Verbesserung des motorischen Funktionsverhaltens 6-OHDA-lädierter Tiere im Verlauf und zu einer deskriptiven Verbesserung im Vergleich zu Tieren unter Standardbedingungen (Steiner et al., 2006).

## Amphetamininduziertes Rotationsverhalten

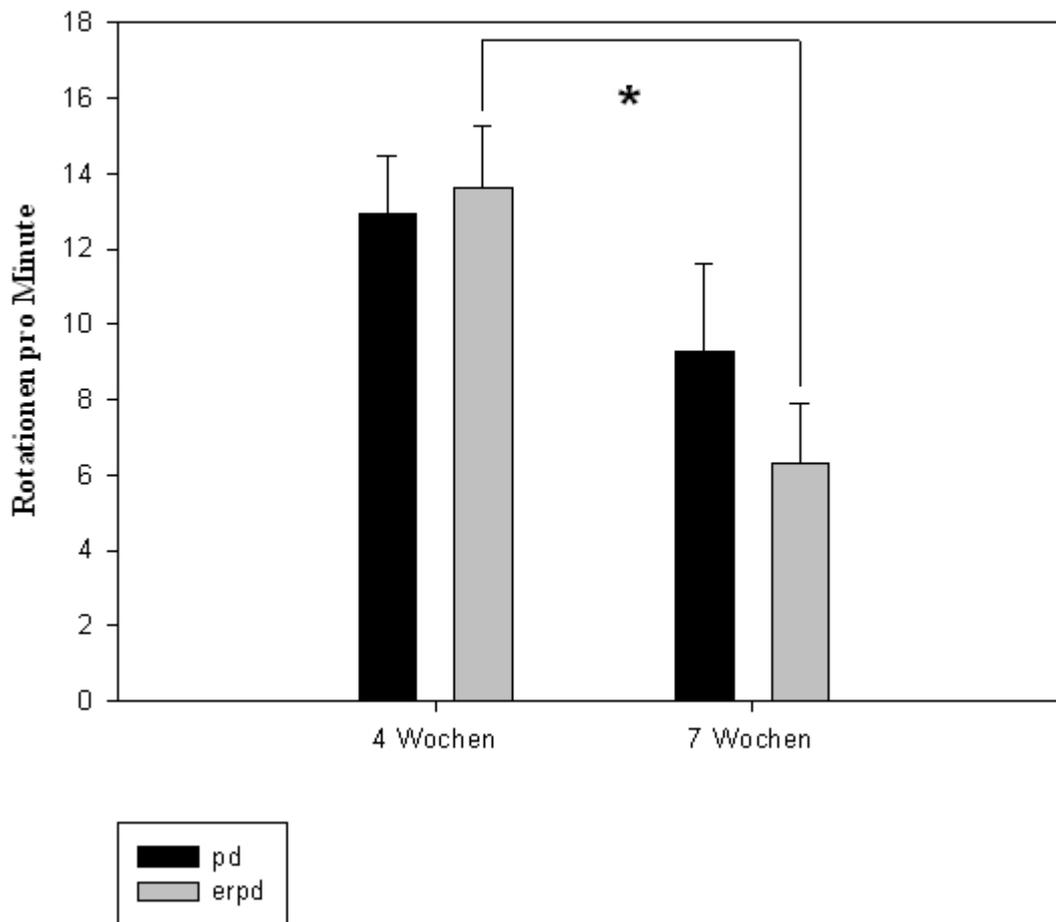


Abb. 16 Amphetamininduziertes Rotationsverhalten nach 4 und nach 7 Wochen für die einzelnen experimentellen Gruppen. \*  $p < 0,05$ . Daten als Mittelwert und Fehler als S.E.M. (Steiner et al., 2006). Es wurde ein signifikanter Unterschied beobachtet zwischen den Gruppen erpd nach 4 Wochen und erpd nach 7 Wochen.

Jedoch wurden in der Folgestudie sieben Wochen post lesionem keine signifikanten Veränderungen der zellulären nigralen Proliferation und Differenzierung im Vergleich zu dieser Arbeit gefunden, durch welche die Attenuierung des Rotationsverhaltens bedingt sein könnte (Steiner et al., 2006). Wie bereits diskutiert (siehe 4.4), wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen mehrerer anderer Arbeitsgruppen keine (dopaminerge) Neurogenese mit den von uns verwendeten Methoden und Markern in der SN detektiert und zwar weder nach vier Wochen noch nach sieben Wochen in der Folgestudie. Insofern ist es unwahrscheinlich, dass die beschriebene Attenuierung des

Rotationsverhaltens sieben Wochen post lesionem durch eine neurogenesebedingte Erhöhung der Anzahl dopaminergener Neurone hervorgerufen sein könnte. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre eine durch reizreiche Umgebung und physische Aktivität verminderte Degeneration der dopaminergen Neurone, im Sinne einer Neuroprotektion, über die das nigrostriatale Ungleichgewicht abgeschwächt werden würde. Die Ergebnisse mehrerer Studien sprechen dafür, dass reizreiche Umgebung und regelmäßige körperliche Aktivität, wie Lauftraining, neuroprotektive und apoptoseinhibierende Effekte haben und die Vulnerabilität von Neuronen gegenüber verschiedenen Arten von Noxen senken können (Carro et al., 2001; Cohen et al., 2003; Young et al., 1999). Zur Überprüfung dieses Sachverhaltes wurde die Anzahl der TH exprimierenden Zellen bei Tieren, die in reizreicher Umgebung mit physischer Aktivität gehalten wurden, verglichen mit Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden. Mit  $12,19\% \pm 3,80\%$  der nicht lädierten Gegenseite bei Tieren, die in reizreicher Umgebung mit Lauftraining gehalten wurden im Vergleich zu  $15,19\% \pm 8,78\%$  bei Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden, ergaben sich fast identische Werte. Dies lässt vermuten, dass die funktionelle Verbesserung des motorischen Verhaltens lädierter Tiere weder durch verminderte Degeneration noch durch Genese neuer dopaminergener Neurone bedingt ist und, dass physiologische Stimuli wie reizreiche Umgebung und physische Aktivität kein vermehrtes dopaminerges Zellüberleben und keine verminderte Degeneration dopaminergener Neurone in der 6-OHDA-lädierten SN bewirken.

Da die Zellproliferation und die gliale Differenzierung in der lädierten SN durch reizreiche Umgebung mit physischer Aktivität signifikant gesteigert wurden, stellt sich die Frage, ob diese beiden Phänomene verantwortlich sind für die Verbesserung des motorischen Verhaltens im amphetamininduzierten Rotationstest oder ob diese eher bedingt ist durch den kontinuierlichen körperlichen Übungseffekt der Tiere.

In der Tat könnten die durch reizreiche Umgebung und physische Aktivität induzierten Veränderungen der Mikroumgebung mit gesteigerter Gliazellproliferation, und -differenzierung primär unabhängig von dopaminergen Neuronen zu einer Verbesserung des motorischen Verhaltens führen. Die gesteigerte Anzahl neuer, also BrdU/GFAP immunreaktiver, astrozytärer Zellen bei Haltung in reizreicher Umgebung mit körperlicher Aktivität könnte beispielsweise hierfür verantwortlich sein. Schon lange ist bekannt, dass die Rolle der Astroglia sich nicht auf die gewebliche Stützfunktion beschränkt sondern vielfältig ist und neuronale Funktionen entscheidend beeinflusst. So sind Astrozyten beteiligt an der Permeabilitätsregulation der Blut-Hirn-Schranke und somit dem Stoffwechsel zwischen Neuronen und Blutkreislauf, an der ionalen Homöostase und somit der Regulation von neuronalen Erregungsvorgängen, an der Wiederaufnahme von Neurotransmittern und damit der Signalübertragung, dem Schutz vor glutamatvermittelter Exzitotoxizität sowie der Produktion von Antioxidanzien und

damit der Protektion von Neuronen. Ferner können Astrozyten die Bildung synaptischer Verbindungen im Rahmen von Lernprozessen beeinflussen durch Auswachsen ihrer Fortsätze und Sekretion von Wachstumsfaktoren (Volterra & Meldolesi, 2005). Alle diese astrozytären Funktionen könnten zum verbesserten funktionellen Outcome beitragen und damit diese motorische Verbesserung ohne gleichzeitige Vermehrung dopaminerger Zellen erklären.

Einschränkend ist jedoch zu sagen, dass in der Folgestudie, die sich über sieben Wochen erstreckte, keine signifikanten zellulären Veränderungen gefunden wurden im Vergleich zu der hier präsentierten Studie, die die zellulären Veränderungen nach vier Wochen untersuchte. Es wäre jedoch möglich, dass die beschriebenen Vorgänge, die von Astrozyten bewirkt werden, eine gewisse Zeit brauchen, um funktionelle Veränderungen herbeizuführen.

Es wurde bereits vielfach gezeigt, dass Lauftraining die nigrostriatale dopaminerge Transmission moduliert (Freed und Yamamoto, 1985; Hattori et al., 1994; MacRae et al., 1987; Meeusen et al., 1997). In tierexperimentellen Arbeiten mit Modellen des PS konnte zudem gezeigt werden, dass Tretmühlenlaufen als Form physischer Aktivität bei 6-OHDA-lädierten Ratten zur Kompensation von motorischen Verhaltensdefiziten führt einhergehend mit Abschwächung neurochemischer Defizite (Tillerson et al., 2001 & 2002 & 2003). Diese Studien machten allerdings keine Aussage zur nigralen Proliferation und zu Veränderungen der TH-Immunreaktivität in der SN unter den von ihnen untersuchten Versuchsbedingungen sondern boten lediglich striatale Kompensationsmechanismen als Erklärungsmöglichkeiten an. Im Rahmen dieser Arbeit und der darauf folgenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die durch reizreiche Umgebung und Lauftraining induzierten Reduktionen der motorischen Defizite bei längerer Versuchsdauer einhergehen mit gesteigerter Proliferation von glialen Zellen (Steiner et al., 2006). Jedoch ergänzen sich die Aussagen mit den unseren in der Hinsicht, dass sie nahe legen, dass durch körperliche Aktivität Plastizität im nigrostriatalen System induziert wird.

Als eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Tatsache, dass reizreiche Umgebung und physische Aktivität positive funktionelle Auswirkungen auf das motorische Verhalten der Versuchstiere haben, ohne sich auf die Anzahl dopaminerger Neurone auszuwirken, käme die Veränderung der dopaminergen Transmission über eine Modifikation der Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität als dem Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese in Frage (Kumer & Vrana, 1996).

Zur Klärung der Frage, ob durch die beobachtete Proliferation von Zellpopulationen mit glialen Eigenschaften und im besonderen astrozytärer, GFAP exprimierender Zellen Veränderungen der dopaminergen Transmission induziert werden, könnten Studien beitragen, die Dopamin und seine Metaboliten in der 6-OHDA-lädierten SN und in den nigrostriatalen Projektionsarealen von Tieren, die in reizreicher Umgebung mit physischer

Aktivität gehalten werden, quantifizieren.

#### **4.8 Klinische Relevanz der Arbeit**

In der vorliegenden Studie wird erstmalig die Induktion von adulter nigraler Gliogenese durch physiologische Induktoren der Neurogenese beschrieben (Kempermann et al., 1997; Steiner et al., 2006; Van Praag et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass auch die adulte SN, stimuliert durch reizreiche Umgebung und physische Aktivität, in beträchtlichem Ausmaß zu zellulärer Plastizität fähig ist, und dass es durch diese Bedingungen zur Proliferation von glialen Vorläuferzellen kommt, die prinzipiell die Potenz besitzen, unter definierten Bedingungen *in vitro* und *in vivo* Neurone zu generieren. Damit hat diese Studie einen wichtigen Beitrag zum Verständnis über die Stimulierbarkeit der zellulären Plastizität der SN erbracht und das Differenzierungsprofil proliferierender Zellen unter verschiedenen Bedingungen *in vivo* näher charakterisiert. Die Erkenntnis über die Modulierbarkeit der nigralen zellulären Neurogenese könnte es in Zukunft ermöglichen, dieses Potenzial der SN besser präventiv oder therapeutisch zu nutzen und in der Form zu erweitern, dass die Fähigkeit der erwähnten, neu gebildeten Vorläuferzellen zur neuronalen Differenzierung ausgenutzt werden kann.

Obwohl die verwendeten physiologischen Stimuli der adulten Neurogenese, reizreiche Umgebung und physische Aktivität, nicht suffizient sind, die Generierung neuer dopaminergener Neurone zu induzieren, führen sie jedoch vermutlich zu Veränderungen der Mikroumgebung mit gesteigerter Gliazellproliferation und erhöhten Gliazellzahlen sowie zu einer Verbesserung des motorischen Verhaltens im amphetamininduzierten Rotationstest im 6-OHDA-Modell der Ratte für das PS nach sieben Wochen (Steiner et al., 2006).

Aus klinischer Sicht könnten reizreiche Umgebung und physische Aktivität, beispielsweise in Form von Physiotherapie und Beschäftigungstherapie, über eine durch Induktion zellulärer Plastizität vermittelte Stimulation von endogenen Reparaturmechanismen eine nicht invasive, supportive therapeutische Option für Patienten mit PS darstellen, wenngleich sie auch aufgrund ihres Unvermögens zur Generierung nigraler dopaminergener Neurone keine kausale Therapie darstellen. So könnten die Erfahrung des Neuen und das Leben in einer stimulierenden Umgebung sowie regelmäßige körperliche Aktivität und Physiotherapie über einen motorischen Übungseffekt hinaus aufgrund der von ihnen induzierten Veränderungen der nigralen zellulären Neurogenese zu Abschwächung oder gar Kompensation funktioneller Defizite von Parkinsonpatienten führen. Damit könnten die induzierten Veränderungen der zellulären Plastizität eine mögliche Erklärung für die Beobachtung liefern, dass klinisch physische Aktivität und die Erfahrung des Neuen zu einer Verbesserung motorischer und kognitiver Funktionen von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen im

Allgemeinen und PS im Speziellen führen und letztendlich sogar die Lebenserwartung erhöhen (Bilowit, 1965; Chen et al., 2005; Franklyn et al., 1981; Gage und Storey, 2004; Hurwitz, 1989; Knott, 1957; Palmer, 1986; Sasco, 1992; Sunvisson et al., 1997; Szekely et al., 1982; Toole et al., 2000). Auch wenn die Daten dieser Studie nicht vorbehaltlos auf die humane Situation übertragen werden können, so kann doch die Hypothese aufgestellt werden, dass die Stimulation von zellulärer Plastizität in der SN durch physiologische Stimuli wie reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität das klinische Outcome von Patienten mit PS verbessern könnte.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, das bisher ungenügende Verständnis über das Potenzial und die Regulation der zellulären Plastizität der adulten Substantia nigra (SN) zu erweitern. Dies ist von klinischem Interesse für mögliche Therapiestrategien des Parkinson Syndroms (PS), das sich durch den Untergang dopaminergener Neurone in der SN auszeichnet und bisher nicht kausal behandelbar ist. Neuere Arbeiten zur nigralen Plastizität zeigen, dass in der adulten SN ständig Zellen generiert werden, von denen einige prinzipiell neurogenes Potenzial besitzen. Über die weiterführende wichtige Frage der Neurogenität der SN wird zurzeit jedoch noch kontrovers diskutiert. In mehreren Studien wurde beschrieben, dass Neuro- und Gliogenese im neurogenen Hippocampus durch physiologische Stimuli, wie reizreiche Umgebung und physische Aktivität deutlich gesteigert werden können.

Im Kontext dieser Erkenntnisse wurden in der hier vorgelegten Arbeit die Auswirkungen von reizreicher Umgebung und physischer Aktivität auf die zelluläre Plastizität in der SN adulter nativer sowie 6-OHDA lädierter Ratten, dem Tiermodell des PS, untersucht. Insbesondere sollte die Frage geklärt werden, ob es unter diesen Versuchsbedingungen zu Veränderungen der Proliferation von Zellen mit glialen Markern kommt und ob neuronale Vorläuferzellen generiert werden, die zu dopaminergen Neuronen heranreifen. Es konnte erstmalig durch diese Arbeit gezeigt werden, dass reizreiche Umgebung und Lauftraining sowohl in nativen als auch in 6-OHDA-lädierten Tieren zu einer signifikanten Steigerung der Zellproliferation in der SN führten. Dabei wurde eine verstärkte Neubildung von GFAP- und NG2- positiven glialen Zellen induziert, von denen mehrfach gezeigt wurde, dass sie neuronales Vorläuferpotenzial besitzen können. So wurde für proliferierende NG2- positive Zellen der SN gezeigt, dass sie sich nach Transplantation in den Hippocampus zu Neuronen differenzieren können. In der hier vorgelegten Arbeit waren allerdings in keiner experimentellen Gruppe neu gebildete, TH exprimierende nigrale Neurone nachweisbar. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der meisten anderen Arbeiten zu diesem Thema und stützt das Konzept der ortsspezifischen Neuropermissivität. In weiterführenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch ein funktioneller Einfluss der nicht-neuronalen Proliferationssteigerung in Form eines verbesserten motorischen Verhaltens der lädierten Tiere nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse implizieren, dass reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität im Rahmen der Therapie des PS, z.B. in Form von Beschäftigungs- und Physiotherapie, genutzt werden könnten, um über eine Aktivierung des endogenen plastischen Potenzials kompensatorische Effekte zu erzielen. Die weitere Erforschung und optimierte Ausnutzung dieses Potenzials könnte eine neue Grundlage neuroprotektiver oder

restaurativer Therapieoptionen darstellen.

## Literaturverzeichnis

- Aarsland D, Larsen JP, Lim NG, et al. Range of neuropsychiatric disturbances in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67: 492-6.
- Aguirre AA, Chittajallu R, Belachew S, Gallo V. NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. *J Cell Biol* 2004; 165: 575-89.
- Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 1990; 13: 266-71.
- Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 1962; 135: 1127-8.
- Altman J, Das GD. Autoradiographic Examination of the Effects of Enriched Environment on the Rate of Glial Multiplication in the Adult Rat Brain. *Nature* 1964; 204: 1161-3.
- Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965; 124: 319-35.
- Anderson VC, Burchiel KJ, Hogarth P, Favre J, Hammerstad JP. Pallidal vs subthalamic nucleus deep brain stimulation in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2005; 62: 554-60.
- Aziz TZ, Peggs D, Agarwal E, Sambrook MA, Crossman AR. Subthalamic nucleotomy alleviates parkinsonism in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-exposed primate. *Br J Neurosurg* 1992; 6: 575-82.
- Aziz TZ, Peggs D, Sambrook MA, Crossman AR. Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. *Mov Disord* 1991; 6: 288-92.
- Baker SA, Baker KA, Hagg T. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 575-9.
- Barzilai A, Melamed E. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 2003; 9: 126-32.
- Belachew S, Chittajallu R, Aguirre AA, et al. Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol* 2003; 161: 169-86.
- Benabid AL, Pollak P, Gao D, et al. Chronic electrical stimulation of the ventralis intermedius nucleus of the thalamus as a treatment of movement disorders. *J Neurosurg* 1996; 84: 203-14.

- Bennett DA, Beckett LA, Murray AM, et al. Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Engl J Med* 1996; 334: 71-6.
- Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 2000; 405: 187-91.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 1990; 249: 1436-8.
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR. The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 1994; 72: 507-20.
- Bergmann O, Winter C, Meissner W, et al. Subthalamic high frequency stimulation induced rotations are differentially mediated by D1 and D2 receptors. *Neuropharmacology* 2004; 46: 974-83.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 1973; 20: 415-55.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 11464-9.
- Bezard E, Imbert C, Gross CE. Experimental models of Parkinson's disease: from the static to the dynamic. *Rev Neurosci* 1998; 9: 71-90.
- Bick-Sander A, Steiner B, Wolf SA, Babu H, Kempermann G. Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3852-7.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 2000; 291: 17-20.
- Bilowit DS. Establishing physical objectives in the rehabilitation of patients with Parkinson's disease; gymnasium activities. *Phys Ther Rev* 1956; 36: 176-8.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O. The effect of 1-3,4-dihydroxyphenylalanine (= DOPA) on akinesia in parkinsonism. 1961. *Wien Klin Wochenschr* 2001; 113: 851-4.
- Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000; 3: 537-44.
- Bland ST, Gonzale RA, Schallert T. Movement-related glutamate levels in rat hippocampus, striatum, and sensorimotor cortex. *Neurosci Lett* 1999; 277: 119-22.
- Blandini F, Porter RH, Greenamyre JT. Glutamate and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 1996; 12: 73-94.

- Borta A, Hoglinger GU. Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem* 2007; 100: 587-95.
- Braak H, Braak E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000; 247 Suppl 2: II3-10.
- Brasted PJ, Watts C, Torres EM, Robbins TW, Dunnett SB. Behavioural recovery following striatal transplantation: effects of postoperative training and P-zone volume. *Exp Brain Res* 1999; 128: 535-8.
- Bravi D, Mouradian MM, Roberts JW, Davis TL, Sohn YH, Chase TN. Wearing-off fluctuations in Parkinson's disease: contribution of postsynaptic mechanisms. *Ann Neurol* 1994; 36: 27-31.
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 2003; 467: 1-10.
- Brown RG, MacCarthy B. Psychiatric morbidity in patients with Parkinson's disease. *Psychol Med* 1990; 20: 77-87.
- Bury SD, Eichhorn AC, Kotzer CM, Jones TA. Reactive astrocytic responses to denervation in the motor cortex of adult rats are sensitive to manipulations of behavioral experience. *Neuropharmacology* 2000; 39: 743-55.
- Calza L, Giardino L, Pozza M, Bettelli C, Micera A, Aloe L. Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: in vivo evidence of a role for nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3209-14.
- Cameron HA, Hazel TG, McKay RD. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol* 1998; 36: 287-306.
- Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2001; 435: 406-17.
- Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 2001; 21: 5678-84.
- Carvalho GA, Nikkhah G. Subthalamic nucleus lesions are neuroprotective against terminal 6-OHDA-induced striatal lesions and restore postural balancing reactions. *Exp Neurol* 2001; 171: 405-17.
- Carvalho GA, Nikkhah G. Subthalamic nucleus lesions are neuroprotective against terminal 6-OHDA-induced striatal lesions and restore postural balancing reactions. *Exp Neurol* 2001; 171: 405-17.
- Carvalho GA, Nikkhah G, Matthies C, Penkert G, Samii M. Diagnosis of root avulsions in traumatic brachial plexus injuries: value of computerized tomography myelography and magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 1997; 86: 69-76.

- Carvalho GA, Nikkhah G, Samii M. [Diagnosis and surgical indications of traumatic brachial plexus lesions from the neurosurgery viewpoint]. *Orthopade* 1997; 26: 599-605.
- Carvalho GA, Nikkhah G, Samii M. [Pain management after post-traumatic brachial plexus lesions. Conservative and surgical therapy possibilities]. *Orthopade* 1997; 26: 621-5.
- Chadi G, Cao Y, Pettersson RF, Fuxe K. Temporal and spatial increase of astroglial basic fibroblast growth factor synthesis after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine neurons. *Neuroscience* 1994; 61: 891-910.
- Chen H, Zhang SM, Schwarzschild MA, Hernan MA, Ascherio A. Physical activity and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 2005; 64: 664-9.
- Chen Y, Ai Y, Slevin JR, Maley BE, Gash DM. Progenitor proliferation in the adult hippocampus and substantia nigra induced by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol* 2005; 196: 87-95.
- Chergui K, Akaoka H, Charley PJ, Saunier CF, Buda M, Chouvet G. Subthalamic nucleus modulates burst firing of nigral dopamine neurones via NMDA receptors. *Neuroreport* 1994; 5: 1185-8.
- Chittajallu R, Aguirre A, Gallo V. NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *J Physiol* 2004; 561: 109-22.
- Cohen AD, Tillerson JL, Smith AD, Schallert T, Zigmond MJ. Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. *J Neurochem* 2003; 85: 299-305.
- Cooke SF, Bliss TV. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 2006; 129: 1659-73.
- Cooper O, Isacson O. Intrastratial transforming growth factor alpha delivery to a model of Parkinson's disease induces proliferation and migration of endogenous adult neural progenitor cells without differentiation into dopaminergic neurons. *J Neurosci* 2004; 24: 8924-31.
- Cummings JL. Depression and Parkinson's disease: a review. *Am J Psychiatry* 1992; 149: 443-54.
- Cummins RA, Livesey PJ, Evans JG. A developmental theory of environmental enrichment. *Science* 1977; 197: 692-4.
- Dawson MR, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* 2000; 61: 471-9.
- Dawson MR, Polito A, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24: 476-88.

- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2003; 460: 563-72.
- Diaz J, Ridray S, Mignon V, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P. Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *J Neurosci* 1997; 17: 4282-92.
- Do MT, Bean BP. Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons: modulation by slow inactivation. *Neuron* 2003; 39: 109-20.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999; 97: 703-16.
- Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J* 1995; 27: 339-69.
- Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part II: Oncology, chemotherapy and carcinogenesis. *Histochem J* 1995; 27: 923-64.
- Dostrovsky JO, Lozano AM. Mechanisms of deep brain stimulation. *Mov Disord* 2002; 17 Suppl 3: S63-8.
- Dunnett SB, Bjorklund A, Lindvall O. Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 365-9.
- Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 4080-5.
- Ehninger D, Kempermann G. Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cereb Cortex* 2003; 13: 845-51.
- Ehringer H, Hornykiewicz O. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]. *Klin Wochenschr* 1960; 38: 1236-9.
- El-Khodor BF, Oo TF, Kholodilov N, Burke RE. Ectopic expression of cell cycle markers in models of induced programmed cell death in dopamine neurons of the rat substantia nigra pars compacta. *Exp Neurol* 2003; 179: 17-27.
- Engel U, Wolswijk G. Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells derived from adult rat spinal cord: in vitro characteristics and response to PDGF, bFGF and NT-3. *Glia* 1996; 16: 16-26.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4: 1313-7.

- Evers S, Obladen M. [Epidemiology and therapy of Parkinson disease in inpatient nursing homes]. *Z Gerontol* 1994; 27: 270-5.
- Fabel K, Fabel K, Tam B, et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 2803-12.
- Fahn S. Is levodopa toxic? *Neurology* 1996; 47: S184-95.
- Fahn S, Oakes D, Shoulson I, et al. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 2498-508.
- Fallon J, Reid S, Kinyamu R, et al. In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 14686-91.
- Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991; 114 ( Pt 5): 2283-301.
- Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science* 2002; 298: 556-62.
- Filion M, Tremblay L. Abnormal spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain Res* 1991; 547: 142-51.
- Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 259-72.
- Franklyn S, Kohout L, Stern G, Dunning M. *Physiotherapy in Parkinson's disease*. Tunbridge Wells: Pittman Medical Ltd., 1981.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 710-9.
- Freed CR, Yamamoto BK. Regional brain dopamine metabolism: a marker for the speed, direction, and posture of moving animals. *Science* 1985; 229: 62-5.
- Freundlieb N, Francois C, Tande D, Oertel WH, Hirsch EC, Hoglinger GU. Dopaminergic substantia nigra neurons project topographically organized to the subventricular zone and stimulate precursor cell proliferation in aged primates. *J Neurosci* 2006; 26: 2321-5.
- Frielingsdorf H, Schwarz K, Brundin P, Mohapel P. No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10177-82.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 2003; 23: 9357-66.
- Gage H, Storey L. Rehabilitation for Parkinson's disease: a systematic review of available evidence. *Clin Rehabil* 2004; 18: 463-82.
- Garcia L, D'Alessandro G, Bioulac B, Hammond C. High-frequency stimulation in Parkinson's disease: more or less? *Trends Neurosci* 2005; 28: 209-16.

- Gingrich JA, Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 1993; 16: 299-321.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 1999; 23: 257-71.
- Glenn JA, Ward SA, Stone CR, Booth PL, Thomas WE. Characterisation of ramified microglial cells: detailed morphology, morphological plasticity and proliferative capability. *J Anat* 1992; 180 ( Pt 1): 109-18.
- Goetz CG, Stebbins GT, 3rd, Klawans HL, et al. United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry on adrenal medullary transplants: presurgical, and 1- and 2-year follow-up. *Neurology* 1991; 41: 1719-22.
- Gomez-Pinilla F, So V, Kesslak JP. Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. *Neuroscience* 1998; 85: 53-61.
- Gomide VC, Silveira GA, Chadi G. Transient and widespread astroglial activation in the brain after a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. *Int J Neurosci* 2005; 115: 99-117.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 1999; 2: 260-5.
- Gould E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* 2002; 22: 619-23.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 1997; 17: 2492-8.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 1999; 286: 548-52.
- Gould E, Tanapat P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 1997; 80: 427-36.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 1988; 96: 379-94.
- Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147: 229-63.
- Guridi J, Herrero MT, Luquin MR, et al. Subthalamotomy in parkinsonian monkeys. Behavioural and biochemical analysis. *Brain* 1996; 119 ( Pt 5): 1717-27.
- Hagell P, Piccini P, Bjorklund A, et al. Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2002; 5: 627-8.
- Hagg T. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci* 2005; 28: 589-95.

- Hammond C, Deniau JM, Rizk A, Feger J. Electrophysiological demonstration of an excitatory subthalamonigral pathway in the rat. *Brain Res* 1978; 151: 235-44.
- Harms KJ, Dunaevsky A. Dendritic spine plasticity: Looking beyond development. *Brain Res* 2006.
- Hastings NB, Gould E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* 1999; 413: 146-54.
- Hattori S, Naoi M, Nishino H. Striatal dopamine turnover during treadmill running in the rat: relation to the speed of running. *Brain Res Bull* 1994; 35: 41-9.
- Hauser RA, Zesiewicz TA. Clinical trials aimed at detecting neuroprotection in Parkinson's disease. *Neurology* 2006; 66: S58-68.
- Hefti F, Melamed E, Sahakian BJ, Wurtman RJ. Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacol Biochem Behav* 1980; 12: 185-8.
- Hely MA, Morris JG, Reid WG, Trafficante R. Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov Disord* 2005; 20: 190-9.
- Hilker R, Portman AT, Voges J, et al. Disease progression continues in patients with advanced Parkinson's disease and effective subthalamic nucleus stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1217-21.
- Hirsch EC. Nigrostriatal system plasticity in Parkinson's disease: effect of dopaminergic denervation and treatment. *Ann Neurol* 2000; 47: S115-20; discussion S120-1.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967; 17: 427-42.
- Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 2004; 7: 726-35.
- Holmin S, Almqvist P, Lendahl U, Mathiesen T. Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 65-75.
- Hommes OR, Leblond CP. Mitotic division of neuroglia in the normal adult rat. *J Comp Neurol* 1967; 129: 269-78.
- Huang FL, Huang KP, Wu J, Boucheron C. Environmental enrichment enhances neurogranin expression and hippocampal learning and memory but fails to rescue the impairments of neurogranin null mutant mice. *J Neurosci* 2006; 26: 6230-7.
- Hudson JL, van Horne CG, Stromberg I, et al. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 1993; 626: 167-74.

- Hughes AJ, Ben-Shlomo Y, Daniel SE, Lees AJ. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology* 1992; 42: 1142-6.
- Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1993; 50: 140-8.
- Hurwitz A. The benefit of a home exercise regimen for ambulatory Parkinson's disease patients. *J Neurosci Nurs* 1989; 21: 180-4.
- Jessberger S, Kempermann G. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 2707-12.
- Jones LL, Yamaguchi Y, Stallcup WB, Tuszynski MH. NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 2002; 22: 2792-803.
- Jones TA, Schallert T. Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage. *J Neurosci* 1994; 14: 2140-52.
- Kay JN, Blum M. Differential response of ventral midbrain and striatal progenitor cells to lesions of the nigrostriatal dopaminergic projection. *Dev Neurosci* 2000; 22: 56-67.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 2004; 27: 447-52.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997; 386: 493-5.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; 418: 50-6.
- Kim SH, Kim HB, Jang MH, et al. Treadmill exercise increases cell proliferation without altering of apoptosis in dentate gyrus of Sprague-Dawley rats. *Life Sci* 2002; 71: 1331-40.
- Kippin TE, Kapur S, van der Kooy D. Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *J Neurosci* 2005; 25: 5815-23.
- Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* 1998; 152: 259-77.
- Kleim JA, Lussnig E, Schwarz ER, Comery TA, Greenough WT. Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning. *J Neurosci* 1996; 16: 4529-35.

- Knott M. Report of a case of parkinsonism treated with proprioceptive facilitation technics. *Phys Ther Rev* 1957; 37: 229.
- Kolb B, Whishaw IQ. Brain plasticity and behavior. *Annu Rev Psychol* 1998; 49: 43-64.
- Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 2000; 289: 1754-7.
- Kornack DR, Rakic P. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 2001; 294: 2127-30.
- Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4752-7.
- Kuhn AA, Kupsch A, Schneider GH, Brown P. Reduction in subthalamic 8-35 Hz oscillatory activity correlates with clinical improvement in Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 1956-60.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996; 16: 2027-33.
- Kumer SC, Vrana KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 1996; 67: 443-62.
- Kupsch A, Anneke R. *Ärztlicher Ratgeber Parkinson - Der Krankheit aktiv begegnen, die Lebensqualität erhalten.* 2001.
- Kupsch A, Benecke R, Muller J, et al. Pallidal deep-brain stimulation in primary generalized or segmental dystonia. *N Engl J Med* 2006; 355: 1978-90.
- Kupsch A, Sauer H, Oertel WH. [Transplantation of dopamine producing nerve cells: a new therapy in idiopathic Parkinson syndrome?]. *Nervenarzt* 1991; 62: 80-91.
- Lee CS, Schulzer M, Mak EK, et al. Clinical observations on the rate of progression of idiopathic parkinsonism. *Brain* 1994; 117 ( Pt 3): 501-7.
- Levine JM. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J Neurosci* 1994; 14: 4716-30.
- Levine JM, Nishiyama A. The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect Dev Neurobiol* 1996; 3: 245-59.
- Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 2001; 24: 39-47.
- Lewy FH. *Paralysis agitans I. Pathologische Anatomie.* Vol Band III: Springer, 1912.
- Li J, Ding YH, Rafols JA, Lai Q, McAllister JP, 2nd, Ding Y. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neurosci Lett* 2005; 386: 160-4.
- Lidow MS, Rakic P. Neurotransmitter receptors in the proliferative zones of the developing primate occipital lobe. *J Comp Neurol* 1995; 360: 393-402.

- Lie DC, Dziejczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 2002; 22: 6639-49.
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 1990; 247: 574-7.
- Liste I, Guerra MJ, Caruncho HJ, Labandeira-Garcia JL. Treadmill running induces striatal Fos expression via NMDA glutamate and dopamine receptors. *Exp Brain Res* 1997; 115: 458-68.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 2074-7.
- MacRae PG, Spirduso WW, Cartee GD, Farrar RP, Wilcox RE. Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolite levels. *Neurosci Lett* 1987; 79: 138-44.
- Madrazo I, Leon V, Torres C, et al. Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1988; 318: 51.
- Mallon BS, Shick HE, Kidd GJ, Macklin WB. Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J Neurosci* 2002; 22: 876-85.
- Markakis EA, Gage FH. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol* 1999; 406: 449-60.
- McTigue DM, Wei P, Stokes BT. Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord. *J Neurosci* 2001; 21: 3392-400.
- Meeusen R, Smolders I, Sarre S, et al. Endurance training effects on neurotransmitter release in rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Acta Physiol Scand* 1997; 159: 335-41.
- Meissner W, Guigoni C, Cirilli L, et al. Impact of chronic subthalamic high-frequency stimulation on metabolic basal ganglia activity: a 2-deoxyglucose uptake and cytochrome oxidase mRNA study in a macaque model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 1492-500.
- Meissner W, Harnack D, Paul G, et al. Deep brain stimulation of subthalamic neurons increases striatal dopamine metabolism and induces contralateral circling in freely moving 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurosci Lett* 2002; 328: 105-8.
- Meissner W, Leblois A, Hansel D, et al. Subthalamic high frequency stimulation resets subthalamic firing and reduces abnormal oscillations. *Brain* 2005; 128: 2372-82.

- Mitchell IJ, Clarke CE, Boyce S, et al. Neural mechanisms underlying parkinsonian symptoms based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience* 1989; 32: 213-26.
- 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* 2005; 132: 767-76.
- Moller JC, Bandmann O, Oertel WH. [The therapy of the parkinsonian syndrome]. *Dtsch Med Wochenschr* 1999; 124: 219-22.
- Morris SM. The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells. *Mutat Res* 1991; 258: 161-88.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 1992; 116: 201-11.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Tyrosine Hydroxylase. the Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem* 1964; 239: 2910-7.
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2000: 277-90.
- Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Van Evercooren AB. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 4357-66.
- Nakano K. Neural circuits and topographic organization of the basal ganglia and related regions. *Brain Dev* 2000; 22 Suppl 1: S5-16.
- Nakao N, Nakai E, Nakai K, Itakura T. Ablation of the subthalamic nucleus supports the survival of nigral dopaminergic neurons after nigrostriatal lesions induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Ann Neurol* 1999; 45: 640-51.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 1995; 373: 109.
- Nishiyama A. NG2 cells in the brain: a novel glial cell population. *Hum Cell* 2001; 14: 77-82.
- Nishiyama A, Chang A, Trapp BD. NG2+ glial cells: a novel glial cell population in the adult brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 1113-24.
- Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res* 1996; 43: 299-314.
- Nishiyama A, Watanabe M, Yang Z, Bu J. Identity, distribution, and development of polydendrocytes: NG2-expressing glial cells. *J Neurocytol* 2002; 31: 437-55.

- Nishizawa Y, Kurihara T, Masuda T, Takahashi Y. Immunohistochemical localization of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in adult bovine cerebrum and cerebellum. *Neurochem Res* 1985; 10: 1107-18.
- Ohtani N, Goto T, Waeber C, Bhide PG. Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *J Neurosci* 2003; 23: 2840-50.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 54: 403-14.
- Olanow CW, Jenner P, Brooks D. Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998; 44: S167-74.
- Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 123-44.
- Pakkenberg B, Moller A, Gundersen HJ, Mouritzen Dam A, Pakkenberg H. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54: 30-3.
- Palmer SS, Mortimer JA, Webster DD, Bistevins R, Dickinson GL. Exercise therapy for Parkinson's disease. *Arch Phys Med Rehabil* 1986; 67: 741-5.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 1999; 19: 8487-97.
- Paul G, Meissner W, Rein S, et al. Ablation of the subthalamic nucleus protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2004; 185: 272-80.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, Calif.: Academic Press, 1998.
- Penkert G, Carvalho GA, Nikkhah G, Tatagiba M, Matthies C, Samii M. Diagnosis and surgery of brachial plexus injuries. *J Reconstr Microsurg* 1999; 15: 3-8.
- Piallat B, Benazzouz A, Benabid AL. Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 1408-14.
- Piallat B, Benazzouz A, Benabid AL. Neuroprotective effect of chronic inactivation of the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 1999; 55: 71-7.
- Poewe W. The need for neuroprotective therapies in Parkinson's disease: a clinical perspective. *Neurology* 2006; 66: S2-9.
- Poewe WH, Lees AJ, Stern GM. Low-dose L-dopa therapy in Parkinson's disease: a 6-year follow-up study. *Neurology* 1986; 36: 1528-30.
- Pycock CJ. Turning behaviour in animals. *Neuroscience* 1980; 5: 461-514.

- Raff MC, Miller RH, Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 1983; 303: 390-6.
- Rajput AH, Offord KP, Beard CM, Kurland LT. Epidemiology of parkinsonism: incidence, classification, and mortality. *Ann Neurol* 1984; 16: 278-82.
- Rakic P. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 2002; 22: 614-8.
- Ramsden DB, Parsons RB, Ho SL, Waring RH. The aetiology of idiopathic Parkinson's disease. *Mol Pathol* 2001; 54: 369-80.
- Ravina BM, Fagan SC, Hart RG, et al. Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systematic assessment. *Neurology* 2003; 60: 1234-40.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707-10.
- Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol* 1962; 55: 429-37.
- Sachs C, Jonsson G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol* 1975; 24: 1-8.
- Samii M, Carvalho GA, Nikkhah G, Penkert G. Surgical reconstruction of the musculocutaneous nerve in traumatic brachial plexus injuries. *J Neurosurg* 1997; 87: 881-6.
- Sasco AJ, Paffenbarger RS, Jr., Gendre I, Wing AL. The role of physical exercise in the occurrence of Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1992; 49: 360-5.
- Sauer H, Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 1994; 59: 401-15.
- Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 2005; 130: 813-31.
- Schrag A, Dodel R, Spottke A, Bornschein B, Siebert U, Quinn NP. Rate of clinical progression in Parkinson's disease. A prospective study. *Mov Disord* 2007; 22: 938-45.
- Seki T, Arai Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* 1993; 13: 2351-8.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 2001; 21: 7153-60.
- Shan X, Chi L, Bishop M, et al. 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* 2006; 24: 1280-7.
- Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 2000; 20: 8727-35.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 2001; 410: 372-6.
- Shoulson I. Where do we stand on neuroprotection? Where do we go from here? *Mov Disord* 1998; 13 Suppl 1: 46-8.
- Silkis I. The cortico-basal ganglia-thalamocortical circuit with synaptic plasticity. II. Mechanism of synergistic modulation of thalamic activity via the direct and indirect pathways through the basal ganglia. *Biosystems* 2001; 59: 7-14.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 1998; 86: 353-87.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 2002; 417: 39-44.
- Sonsalla PK, Nicklas WJ, Heikkila RE. Role for excitatory amino acids in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity. *Science* 1989; 243: 398-400.
- Sonsalla PK, Riordan DE, Heikkila RE. Competitive and noncompetitive antagonists at N-methyl-D-aspartate receptors protect against methamphetamine-induced dopaminergic damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256: 506-12.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 2004; 46: 41-52.
- Steiner B, Winter C, Hosman K, et al. Enriched environment induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2006; 199: 291-300.
- Storch A, Jost WH, Vieregge P, et al. Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial on Symptomatic Effects of Coenzyme Q10 in Parkinson Disease. *Arch Neurol* 2007; 64: 938-44.
- Sunvisson H, Lokk J, Ericson K, Winblad B, Ekman SL. Changes in motor performance in persons with Parkinson's disease after exercise in a mountain area. *J Neurosci Nurs* 1997; 29: 255-60.
- Szekely BC, Kosanovich NN, Sheppard W. Adjunctive treatment in Parkinson's disease: physical therapy and comprehensive group therapy. *Rehabil Lit* 1982; 43: 72-6.

- Szele FG, Chesselet MF. Cortical lesions induce an increase in cell number and PSA-NCAM expression in the subventricular zone of adult rats. *J Comp Neurol* 1996; 368: 439-54.
- Tan AM, Colletti M, Rorai AT, Skene JH, Levine JM. Antibodies against the NG2 proteoglycan promote the regeneration of sensory axons within the dorsal columns of the spinal cord. *J Neurosci* 2006; 26: 4729-39.
- Tan AM, Zhang W, Levine JM. NG2: a component of the glial scar that inhibits axon growth. *J Anat* 2005; 207: 717-25.
- Tanaka K, Nogawa S, Ito D, et al. Activation of NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells during post-ischemic reperfusion in the rat brain. *Neuroreport* 2001; 12: 2169-74.
- Tanner CM, Langston JW. Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology* 1990; 40: suppl 17-30; discussion 30-1.
- Taupin P. Adult neurogenesis and neuroplasticity. *Restor Neurol Neurosci* 2006; 24: 9-15.
- Tillerson JL, Caudle WM, Reveron ME, Miller GW. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2003; 119: 899-911.
- Tillerson JL, Cohen AD, Caudle WM, Zigmond MJ, Schallert T, Miller GW. Forced nonuse in unilateral parkinsonian rats exacerbates injury. *J Neurosci* 2002; 22: 6790-9.
- Tillerson JL, Cohen AD, Philhower J, Miller GW, Zigmond MJ, Schallert T. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. *J Neurosci* 2001; 21: 4427-35.
- Toole T, Hirsch MA, Forkink A, Lehman DA, Maitland CG. The effects of a balance and strength training program on equilibrium in Parkinsonism: A preliminary study. *NeuroRehabilitation* 2000; 14: 165-174.
- Trotter J. NG2-positive cells in CNS function and the pathological role of antibodies against NG2 in demyelinating diseases. *J Neurol Sci* 2005; 233: 37-42.
- Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 1968; 5: 107-10.
- Ungerstedt U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol Scand Suppl* 1971; 367: 49-68.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 1970; 24: 485-93.

- Van Kampen JM, Hagg T, Robertson HA. Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D receptor stimulation. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 2377-87.
- Van Kampen JM, Robertson HA. A possible role for dopamine D3 receptor stimulation in the induction of neurogenesis in the adult rat substantia nigra. *Neuroscience* 2005; 136: 381-6.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 13427-31.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999; 2: 266-70.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002; 415: 1030-4.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 2005; 25: 8680-5.
- Volkman J, Allert N, Voges J, Weiss PH, Freund HJ, Sturm V. Safety and efficacy of pallidal or subthalamic nucleus stimulation in advanced PD. *Neurology* 2001; 56: 548-51.
- Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 626-40.
- Ward CD, Gibb WR. Research diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1990; 53: 245-9.
- Weinstein DE, Burrola P, Kilpatrick TJ. Increased proliferation of precursor cells in the adult rat brain after targeted lesioning. *Brain Res* 1996; 743: 11-6.
- Wichmann T, DeLong MR. Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 751-8.
- Winkler C, Kirik D, Bjorklund A. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *Trends Neurosci* 2005; 28: 86-92.
- Winter C, Hosmann K, Harnack D, et al. Subthalamic nucleus lesioning inhibits expression and phosphorylation of c-Jun in nigral neurons in the rat's 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Synapse* 2006; 60: 69-80.
- 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* 2004; 124: 173-81.
- Yoshimi K, Ren YR, Seki T, et al. Possibility for neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain. *Ann Neurol* 2005; 58: 31-40.

- Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 1999; 5: 448-53.
- Young WS, 3rd, Bonner TI, Brann MR. Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 9827-31.
- Yurek DM, Fletcher-Turner A. Differential expression of GDNF, BDNF, and NT-3 in the aging nigrostriatal system following a neurotoxic lesion. *Brain Res* 2001; 891: 228-35.
- Zeevalk GD, Manzino L, Sonsalla PK. NMDA receptors modulate dopamine loss due to energy impairment in the substantia nigra but not striatum. *Exp Neurol* 2000; 161: 638-46.
- Zhao M, Momma S, Delfani K, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7925-30.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben und mich bei meiner Forschungstätigkeit sowohl in wissenschaftlicher als auch in menschlicher Hinsicht unterstützt haben.

Mein Dank gilt zuerst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Kupsch nicht nur für die Überlassung dieses klinisch orientierten, grundlagenwissenschaftlichen Themas, sondern auch für sein kontinuierliches Interesse an meiner Forschungstätigkeit sowie für wertvolle wissenschaftliche Anregungen und seine ständige Unterstützung unter anderem auch bei meinem Studienortswechsel.

Frau Dr. Christine Winter, meiner Betreuerin, gibt mein besonderer Dank. Mit außerordentlichem Enthusiasmus und Optimismus stand sie mir während der gesamten wissenschaftlichen Arbeit von der Themenstellung über die experimentelle Durchführung bis zur wissenschaftlichen Auswertung zur Seite. Ihr stetes Engagement und ihre Diskussionsbeiträge waren mir eine große Hilfe und trugen in entscheidendem Maß zum Gelingen der Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Morgenstern, in dessen Laboratorien ein Großteil der Experimente stattfand, sowie Herrn Dr. Daniel Harnack und den Mitarbeitern des pharmakologischen/neurologischen Labors bin ich zu großem Dank verpflichtet. Insbesondere danke ich Frau Renate Winter und Frau Christiane Kölske für ihre exzellente technische Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Gerd Kempermann sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „neuronale Stammzellen“ des Max-Dellbrück-Zentrums danke ich ebenfalls sehr herzlich für ihre wohlwollende Unterstützung sowie die Möglichkeit, wichtige Teile meiner Promotionsarbeit in ihren Labors anfertigen zu dürfen. Hier möchte ich insbesondere Frau Dr. Barbara Steiner hervorheben und ihr für kritische Denkanstöße und ihre stete kompetente Betreuung bei der histologischen Aufarbeitung sowie der statistischen Auswertung danken.

Ein besonderer Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern und meiner Freundin für ihre stetige verständnisvolle Unterstützung und Liebe.

## **Lebenslauf**

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

## **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Eberhard Siebert, erkläre hiermit an Eides statt, dass die von mir vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**Regulation der zellulären Plastizität in der adulten Substantia nigra: Effekte von reizreicher Umgebung und physischer Aktivität**

selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Es wurden keine anderen als die vollständig angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.“

Datum

Unterschrift