

Aus dem Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Spurenelemente und ihre potentielle Rolle bei Neurodegeneration

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von

Markus Borgmann

aus Minden (Westf.)

---

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Baurle

2. Prof. Dr. med. M. Paul

3. Prof. Dr. med. U. Dirnagl

Datum der Promotion: 09.09.2011

---

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1 Spurenelemente und Neurodegeneration.....	5
1.1.1 Zink.....	6
1.1.2 Eisen.....	10
1.1.3 Kupfer.....	14
1.1.4 Mangan.....	17
1.2 Die Lurcher Mutante.....	20
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Versuchstiere.....	23
2.1.1 Anzahl.....	23
2.1.2 Genotypisierung.....	24
2.1.3 Präparation.....	24
2.1.4 Timm Färbung.....	25
2.2 Die Immersions-Autometallographie-Methode (AMG).....	26
2.3 Röntgen-Fluoreszenz-Spektrometrie (SXRF).....	28
2.3.1 Synchrotronstrahlung.....	28
2.3.2 Speicherring .....	29
2.3.3 Probenpräparation.....	30
2.3.4 Versuchsaufbau.....	31
2.3.5 Fokussierung und Scandauer.....	32
2.3.6 Auswahl des zu scannenden Bereichs (ROI=Region of interest).....	32
2.3.7 Sandwich-Methode.....	33
2.3.8 Datenerfassung.....	34
2.3.9 Bildanalyse mit ImageJ.....	35
2.3.10 Surface-Plots mit ImageJ.....	37
2.3.11 Datenanalyse mit Excel.....	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1 Timm-Färbung.....	38
3.1.1 Postnataler Zeitverlauf von p7-p125 während der normalen	

---

Kleinhirnentwicklung des Wildtyps.....	38
3.1.2 Vergleich: Wildtyp und Lurcher-Mutante.....	44
3.2 Synchrotron-Messungen.....	46
3.2.1 Allgemeine Beobachtungen.....	46
3.2.2 2D Topographie der Zn Verteilung.....	47
3.2.3 2D Topographie der Cu Verteilung.....	47
3.2.4 2D Topographie der Mn Verteilung.....	49
3.2.5 2D Topographie der Fe Verteilung.....	50
3.2.6 Surface-Plots der Zn, Cu, Mn und Fe Verteilungen.....	51
4. Diskussion.....	54
4.1 Methodenkritik.....	54
4.1.1 Timm-Methode.....	54
4.1.2 SXRFS .....	55
4.2 Diskussion der Timm-Ergebnisse.....	56
4.2.1 Zink während der „regulären“ Kleinhirnentwicklung.....	56
4.2.2 Zink im Kleinhirn der Lurcher-Mutante.....	57
4.3 Diskussion der Synchrotron-Ergebnisse.....	59
4.3.1 Eisen.....	59
4.3.2 Zink.....	60
4.3.3 Kupfer.....	61
4.3.4 Mangan.....	61
4.4 Spurenelemente und Neurodegeneration.....	62
5. Zusammenfassung.....	63
5.1 Summary.....	64
6. Literaturverzeichnis.....	65
7. Abkürzungen.....	74
8. Anhang .....	75
8.1 Danksagung.....	75
8.2 Lebenslauf.....	75
8.3 Publikationsliste.....	77
8.4 Erklärung .....	77

---

# 1. Einleitung

## 1.1 Spurenelemente und Neurodegeneration

Spurenelemente erfüllen im menschlichen Organismus vielfältige Funktionen und sind für den Ablauf vieler Stoffwechselprozesse unerlässlich. Elemente wie Eisen, Zink, Kupfer und viele andere sind Bestandteile von Enzymen, katalysieren Redoxreaktionen oder beteiligen sich an der Aufrechterhaltung bzw. Modulation von elektrischen Potentialdifferenzen.

Alle physiologisch relevanten Spurenelemente unterliegen einer mehr oder weniger präzisen Homöostase. Abweichungen der Konzentration von diesem physiologischen Bereich können zu Fehlfunktionen bis hin zu toxischen Effekten führen. Wie ursächlich diese Konzentrationsunterschiede an der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sind, ist eine zentrale Frage zum Verständnis der Mechanismen, die zum neuronalen Zelltod führen.

Von besonderem Interesse ist dabei, ob die veränderten Spurenelementkonzentrationen als Folge- oder Beiprodukt der degenerativen Prozesse entstehen oder ob sie aktiv an den Mechanismen des Zelltods teilnehmen(1).

Verschiedene Forschungsprojekte befassen sich mit der Bedeutung einiger Metallionen im cerebralen Stoffwechsel, wie z.B. in (2). Gegenstand der Untersuchungen sind hier neben der Aufnahme, Speicherung und Freisetzung der Elemente auch ihre potentiellen Eigenschaften als Neurotransmitter und ihre Fähigkeit, synaptische Übertragungen zu modulieren(3). Eine potentielle Beteiligung an neurodegenerativen Prozessen(4) ist ein weiterer wichtiger Punkt und nicht zuletzt Gegenstand dieser Arbeit .

Ziel der Arbeit ist es, die subzelluläre Verteilung wichtiger Spurenelemente im Gehirn zu untersuchen und Unterschiede zwischen einem Mausmodell (Lurcher) mit postnataler

---

Neurodegeneration im Vergleich zu Wildtyp Tieren zu beschreiben. Durch Verwendung der SXRF Methode sollen so etwaige Konzentrations- und Verteilungsabweichungen vor dem Hintergrund neuronalen Zelluntergangs untersucht werden.

Aufgrund bestehender Voruntersuchungen mit Hilfe der Neutronenaktivationsanalyse (NAA)(5), die eine Zunahme der Zinkkonzentration im Kleinhirn der Lurcher-Mutante während der ersten postnatalen Wochen zeigte, soll zudem die Zn-Verteilung während dieser Zeit im Vergleich zwischen Lc-Mutante und Wildtyp mit einer konventionellen Färbemethode (AMG) analysiert werden.

### 1.1.1 Zink

Ein Metall, dem nach heutigem Wissensstand eine besondere Bedeutung bei neurodegenerativen Prozessen, insbesondere beim Morbus Alzheimer (AD), beigemessen werden kann, ist das Zink. Es erfüllt eine Reihe physiologischer Funktionen im Rahmen der Regulation des allgemeinen Erregungszustandes des Gehirns. Grundsätzlich kann man für dieses Element eine inhibitorische Wirkung nachweisen(3).

Untersuchungen an Nervengewebe, das durch Hypoxie oder Trauma geschädigt war, konnten außerdem zeigen, dass hier die Konzentration von extrazellulärem Zink deutlich ansteigt, was zu der Annahme einer direkten Beteiligung an apoptotischen Vorgängen führte(6).

#### Transport/Homöostase

Der überwiegende Anteil des cerebralen Zinks wird nicht in freier Form, sondern per Cotransport mit Histidin transportiert(7).

Die Aufnahme in Neurone erfolgt auf verschiedenen Wegen: 1. Passiver Durchtritt durch Kanäle. Zu nennen sind hier der *NMDA*-Kanal, spannungsabhängige  $Ca^{2+}$  - Kanäle und *AMPA/Kainat*-Kanäle(8).

Darüberhinaus existieren verschiedene aktive Transportmechanismen. Die Funktion des Transporters für zweiwertige Kationen (*DMT-1*) als direktem Zn-Transporter scheint hierbei gesichert(9), während es für die Gruppe der Zink-Transporter (*ZnT*) Hinweise

gibt, dass diese nur indirekt modulierend auf den Zn-Transport einwirken(10).

Die intrazelluläre Speicherung von Zink erfolgt auf zwei Wegen:

- **Vesikulär:** Im Soma (genauer im Golgi-Apparat) Glutamat und Zink freisetzender Neurone werden Vesikel synthetisiert, die sowohl den Transmitter als auch das Metall enthalten. In der Membran dieser Neurone befindet sich außerdem der Zink -Transporter ZnT-3. Die Vesikel werden axonal zur präsynaptischen Endigung transportiert, und dort durch eintreffende Aktionspotentiale bzw. den daraus resultierenden Calcium-Einstrom entleert(3) .
- **Metallothioneine:** Thioneine sind kleine (~3000 Da), stark schwefelhaltige Proteine, die über Cysteinreste in der Lage sind, Zink sowohl zu binden, als auch wieder freizusetzen. Die Freisetzung erfolgt durch Nitrosylierung oder Oxidation der Thiol-Liganden(11). Von besonderer Bedeutung ist hier das Metallothionein 3 (MT-3), das nur im Gehirn und den Testes zu finden ist.

Spezifisches Protein	Hauptwirkung von Zink
<b>Glutamat-Rezeptoren</b>	
AMPA	+/-
NMDA	Tonische Inhibition, Phasischer Effekt vermutet
Metabotrope	-
<b>Andere Rezeptoren</b>	
GABA <sub>A</sub>	Meist -
GABA <sub>B</sub>	-
Acetylcholin	+/-
Adenosin	+/-
Serotonin	-
Dopamin	+/-
Katecholamine	+/-
Melanocortin	+
Zink-Rezeptor	Mobilisiert intrazelluläres Calcium
Protonen-Rezeptor	Zink/Protonen Synergie
Opioide	-
<b>Kanäle</b>	
Ca <sup>2+</sup>	Blockade
K <sup>+</sup>	+/-
Na <sup>+</sup>	Gemischt
Cl <sup>-</sup>	Erleichtert Cl <sup>-</sup> Passage
<b>Transporter</b>	
Glutamat	Verringert Transportrate
Dopamin	Verringert Transportrate

+ = Exzitatorisch      - = Inhibitorisch

**Tab.1 : Zink-Angriffspunkte im ZNS<sup>3</sup>**

Man nimmt an, dass MT-3 bei Schädigungen massiv Zink freisetzt und somit indirekt zytotoxisch wirkt(12). Experimente mit Mäusen ohne MT-3 ergaben auf den ersten Blick

---

widersprüchliche Ergebnisse. Während Läsionen im hippocampalen Feld CA1 nur geringgradige Zellschäden erzeugte, kam es im Feld CA3 durch Fehlen des Metallothioneins(13) zu größeren Zellschäden. Diese Diskrepanz könnte dadurch hervorgerufen werden, dass in CA3 die präsynaptische Zinkfreisetzung so hoch ist, dass *MT-3* hier eher als Zink-Akzeptor agierte. Durch den Mangel an *MT-3* konnten erhöhte Konzentrationen des Metalls somit nicht mehr abgepuffert werden, wodurch die toxische Grenze überschritten wurde.

### Physiologische Funktionen

Zink ist Bestandteil einer Reihe von Enzymen. Zu nennen sind hier z.B. Zinkfingerproteine, die regulatorisch an der DNA arbeiten oder die CuZn-Superoxid-Dismutasen (*CuZnSOD*), die Superoxid-Radikale zu  $H_2O_2$  umwandeln.

Aus neurophysiologischer Sicht spricht man Zink im ZNS im Allgemeinen eine hemmende Wirkung auf exzitatorische und inhibitorische Rezeptoren zu. Die Wirkmechanismen sollen an zwei Kanalproteinen eingehender erläutert werden:

- **NMDA-Kanal:** Der glutamaterge NMDA-Kanal besitzt vier bekannte Bindungsstellen für Zink(14). Bedeutend ist außerdem die Möglichkeit der Langzeit-potenzierung (LTP) über *NR2s*. Nach länger andauernder Stimulation kommt es zur Phosphorylierung von Tyrosinresten der *NR2* Untereinheiten. Als Folge sinkt deren Affinität zu Zink, die inhibitorische Wirkung nimmt ab, die Aktivität des Kanals wird gesteigert und es kommt zur LTP(15).
- ***GABA<sub>A</sub>* – Rezeptor:** Der inhibitorische *GABA<sub>A</sub>* – Rezeptor scheint ebenfalls durch Zink gehemmt zu werden. Interessant ist hierbei die Vermutung, dass die Einsprossung Zink freisetzender Axone in ektopische Regionen und die nachfolgende Freisetzung der Zn-Ionen dort zur Hemmung *GABA*-erger Rezeptoren führen kann. Mögliche Folge ist eine erhöhte Anfallswahrscheinlichkeit durch die allgemeine Enthemmung(16).

Da Zink offensichtlich, je nach Lokalisation und Rezeptortyp, sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Wirkungen hat, scheint seine Funktion im Gehirn deutlich komplexer



---

zu sein als zunächst angenommen.

### Neurotoxizität und Neurodegeneration

Obwohl Zink keinerlei Redox-Aktivität besitzt und nicht als toxisch gilt, gibt es Hinweise darauf, dass freies, ionisiertes Zink direkt zum Untergang von Neuronen und Gliazellen führen kann. Während sehr hohe Konzentrationen zu Anzeichen von Nekrose, wie Anschwellen der Zellen und Zerstörung von Zellorganellen führen, wurden bei niedrigeren Konzentrationen apoptotische Aktivitäten beobachtet, die durch den Nachweis von Caspaseaktivität und DNA-Fragmentierung erhärtet wurden(17).

Bei Hirntraumata, akuter Hypoxie (ischämischer Insult, Blutungen) oder epileptischen Anfällen kann es zu exzitotoxischen Effekten mit nachfolgendem Zellverlust kommen. Geschädigte Neurone zeigen eine herabgesetzte Erregungsschwelle durch Überlastung der Na/Ka-ATPase, die das Ruhemembranpotential nicht mehr aufrechterhalten kann. Die erhöhte Aktivität des mitochondrialen Energiestoffwechsels setzt vermehrt ROS frei und erzeugt dadurch oxidativen Stress. Die überlasteten Neurone schütten vermehrt exzitatorische Transmitter wie Glutamat aus und verursachen damit einen massiven  $Ca^{2+}$  Influx in nachgeschaltete Neurone, die nun ebenfalls exzitatorischem Stress ausgesetzt sind.

Das simultan an diesen Synapsen freigesetzte Zink scheint durch seine inhibitorische Wirkung auf *NMDA*-Rezeptoren zunächst protektiv zu wirken(18). Allerdings steigt gerade in diesen geschädigten bzw. degenerierenden Neuronen auch die Menge an intrazellulärem, freiem Zink, was auf eine Freisetzung aus anderen, intrazellulären Zinkspeichern schließen lässt(19). Diese differenzierte Multifunktionalität und Multilokalität von Zn in überexcitierten Neuronen lässt bisher nicht erkennen, in welchem Verhältnis protektive und schädigende Wirkungen zueinander stehen. Aus diesem Grund und auch im Hinblick auf potentielle therapeutische Interventionen ist es erforderlich, die Mechanismen, die zur veränderten Zn-Homöostase führen, bei den einzelnen neurodegenerativen Syndromen und Erkrankungen zu identifizieren.

---

## Neurodegeneration

Eine neurodegenerative Erkrankung mit vergleichsweise hoher Prävalenz (17,4% bei den über 75 jährigen in Deutschland(20)) ist der Morbus Alzheimer. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer Anreicherung von  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ ), einem Spaltprodukt des Amyloid Precursor Proteins (APP) in der Hirnrinde.  $A\beta$  besitzt zwei Zink-Bindungsstellen, deren Besetzung zum einen die biologische Halbwertszeit des Polypeptids durch Verhinderung proteolytischer Angriffe erhöht und zum anderen die Aggregation fördert(21). Letztere lässt sich durch Chelatbildner komplett revidieren(22). Die orale Applikation schwacher Chelatoren zeigte sich im Tierversuch als sehr vielversprechend(23). Ein weiterer Ansatz war die Applikation eines stärkeren Chelators (BAPTA) in Form eines Prodrugs. Lipophil und durch Anbau von Alkylketten inaktiviert, passiert DP-109 (das Prodrug) die Blut-Hirnschranke, baut sich in die Zellmembran ein und wird erst dort durch Membranlipasen aktiviert. Man nimmt an, dass die komplexierende Wirkung des Chelators primär in der Nähe der Membran geschieht und so die Konzentration des Zinks insgesamt nicht stark verändert wird. In Versuchen mit TG2576-Mäusen (entwickeln Alzheimer-ähnliche  $A\beta$ -Ablagerungen) reduzierte sich der  $A\beta$ -Plaque-Load um 60-80 % ohne nennenswerte Nebenwirkungen(24). Am Menschen konnten allerdings bislang keine nennenswerten Erfolge in der Therapie der Erkrankung durch Zinkchelatoren erzielt werden.

### 1.1.2 Eisen

Eisen, als essentieller Bestandteil des Hämoglobins lebensnotwendig, scheint im Zusammenhang mit neurodegenerativen Prozessen ebenfalls eine Rolle zu spielen. Es ist nicht nur in den Mitochondrien vorhanden, wo es als Teil einiger Cytochrome die Funktion der Atmungskette ermöglicht, sondern kann, ähnlich dem Selen, unter den Bedingungen

Speicherform	Relativer Anteil
Hämoglobin	67 %
Ferritin	27 %
Myoglobin	3,5 %
labiles Eisendepot	2,2 %
eisenhaltige Enzyme	0,2 %

Tabelle 1: Eisenverteilung im menschlichen Körper

von oxidativem Stress eine wichtige Funktion im Gehirn ausüben. Die Redoxaktivität

---

des freien Eisens könnte bei der Entstehung von Radikalen wie OHT und HT eine besondere Bedeutung besitzen. Aufgrund seiner mannigfaltigen Funktionen im Körper sind Aufnahme und Transport relativ gut erforscht. Diese Forschungsergebnisse sind Grundlage weitergehender Untersuchungen des Metalls im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen.

### Transport / Homöostase

Der menschliche Körper enthält etwa zwei bis vier Gramm Eisen, die sich wie in Tabelle 1(25) ersichtlich im Körper verteilen.

Die tägliche Eisenaufnahme ist sehr gering. Während bei normaler Ernährung etwa 10-30 mg pro Tag zugeführt werden, gelangen nur etwa 10 % davon tatsächlich in den Organismus. Da es keine bekannten Ausscheidungsmechanismen gibt und der Verlust durch Blutungen und über die Haut bei ca. 1 mg (♂) bzw. 3 mg (♀) pro Tag liegt, reicht die geringe Aufnahmequote dennoch aus. Größere Blutverluste können aufgrund dieser Bilanz allerdings schnell zu Eisenmangel führen. Verstärkte orale Zufuhr von Eisen bleibt wegen des leistungsschwachen Transportsystems in der Regel folgenlos. Hyperämien sind entweder Folge eines genetischen Defektes (z.B. Hämochromatose) oder exzessiver, intravenöser Eisenzufuhr.

Primärer Transporter für Eisen ist das Transferrin (TF). Es besitzt eine sehr hohe Affinität zur dreiwertigen Form, verhindert Präzipitation der freien Form und sorgt dafür, dass das oxidativ aktive Metall keine Zellschäden verursacht(26). TF ist Ligand des membranständigen TF-Rezeptors (TFR). Beladenes TF dockt an seinen Rezeptor an und beide gelangen per Endozytose ins Innere der Zelle, genauer ins Endosom. Hier werden infolge des niedrigen pH Protein und Metall voneinander getrennt und Letzteres zur zweiwertigen Form reduziert. Danach wird das  $Fe^{2+}$  durch den Transporter für zweiwertige Metalle (*DMT-1*) zurück ins Zytosol befördert, TF exozytiert und TFR wird wieder in die Zellmembran eingebaut(26). Alternativ kann freies  $Fe^{2+}$  vom gleichen Transporter (*DMT-1*) auch direkt durch die Zellmembran in die Zelle aufgenommen werden(27).

Der molekulare Speicher für Eisen ist Ferritin. Das etwa 20kDa große Protein kann bis

---

zu 4500 Fe-Atome aufnehmen.

Reguliert wird der Eisen-Stoffwechsel auf Ebene von TFR und Ferritin. Bei intrazellulärem Mangel an molekularem Eisen wird die Ferritinsynthese gedrosselt und die des TFR's erhöht. Bei einem Überschuss wird gegensätzlich verfahren. Verantwortlich hierfür sind die beiden Eisenregulationsproteine *IRP1* und *IRP2*, die beide auf Translationsebene wirken. Überschüssiges Eisens wird über den Transporter *Ireg1* (gleichbedeutend mit *Ferroportin/MTP1*) ausgeschleust, der vor allem in Enterozyten und Makrophagen zu finden ist.

Das Kleinhirn weist bezüglich der Eisen-Homöostase einige Besonderheiten auf. In Caeruloplasmin KO Mäusen ( $CP^{-/-}$ ), führt der Verlust der Ferrioxidaseaktivität zu Eisenakkumulation und anschließender Neurodegeneration in weiten Teilen des Gehirns, nicht aber im Kleinhirn(28). Hier zeigen sich Purkinjezellen in ( $CP^{-/-}$ ) sogar eisendefizient. Zusammen mit dem fehlenden Nachweis von *TfR*(28) und *IRP1* in diesen Zellen, sowie dem erhöhten Vorkommen von *IRP2*(29) und *MTP1* ist ein PC-spezifischer Eisenhaushalt zu vermuten.

Eine wichtige Rolle scheint hier mitochondriales Ferritin – *MtFt* einzunehmen(30). Funktionell scheint *MtFt* mehr ein „Eisenfänger“ in metabolisch hochaktiven Zellen zu sein, als ein Eisenspeicher.

### Physiologische Funktionen

Im Gegensatz zu Zn konnte für Fe bis heute keine Rolle als Co-Transmitter oder eine Beteiligung an Signaltransduktionswegen nachgewiesen werden. Außer den bereits genannten Funktionen in den Mitochondrien lässt sich in der aktuellen Literatur kein Hinweis auf ZNS-spezifische Funktionen des Metalls finden.

### Fe und Neurodegeneration

Aufgrund seines Redoxpotentials und der essentiellen Funktion des Eisens im mitochondrialen Energiestoffwechsel kommt Fe eine ganz besondere Bedeutung im

---

Zusammenhang mit oxidativem Stress zu. Dies gilt insbesondere dann, wenn akute oder chronische Überlastung auf die Neurone einwirkt, weil dann die metabolische Belastung und damit die Produktion reaktiver Oxygen Spezies dramatisch zunimmt. Dopaminerge Neurone sind diesbezüglich besonders empfindlich, weil sie geringe GPX-Level aufweisen, Dopamin zum toxischen 6-OHDA oxidiert werden kann und  $H_2O_2$  bei den durch  $MAO_{A/B}$  katalysierten Reaktionen entsteht.

Beim M. Parkinson lassen sich in vielen Fällen erhöhte Fe-Konzentrationen in der Substantia Nigra nachweisen(31).

Das  $\alpha$ -Synuclein bildet einen großen Teil der sogenannten Lewy-Körperchen, die bei der idiopathischen Form des Morbus Parkinson verstärkt in der Substantia Nigra erscheinen. Es ist verklumpt und weist zum Teil Fehler in der Sekundärstruktur auf. Es gibt Hinweise darauf, dass Eisen diese Verklumpung fördert, z.B. durch das Maskieren negativer Ladungen des Proteins, bevor es seine endgültige Raumstruktur bilden kann. Diese unfertigen bzw. falsch gefalteten  $\alpha$ -Synucleine neigen stärker zur Akkumulation als die herkömmliche Form(32).

Allerdings treten bei der genetisch determinierten, juvenilen Form des Morbus Parkinson keine oder nur wenige Lewy-Körperchen auf, was Eisen als Verursacher der Krankheit in Frage stellt. Interessanterweise führte der lentivirale Einbau des defekten „Parkin“-Gens des juvenilen Parkinsonismus bei Mäusen zu vermehrter Entstehung von Lewy-Körperchen bei gleichzeitig verminderter Symptomatik der Erkrankung(33). Dies widerspricht anderen Untersuchungen in(34), denzufolge das Antibiotikum Rifampicin, die Entstehung der Körperchen verhindert, bzw. die  $\alpha$ -Synuclein-Fibrillen sogar auflösen kann, was im Versuch zur Besserung der Symptomatik führte und Rifampicin somit als potentiell Therapeutikum bei der Behandlung des M. Parkinson qualifiziert.

Auch beim Morbus Alzheimer finden sich in den  $\beta$ -Amyloid-Plaques erhöhte Eisen-Konzentrationen, die funktionelle Rolle des Metalls ist hier jedoch bislang unklar(3).

Darüberhinaus existieren einige weitere Erkrankungen, die die Eisen-Homöostase beeinflussen, so z.B. das genetisch determinierte Hallervorden-Spatz-Syndrom, heute „Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation“ (NBIA) genannt. Hier liegt ein Defekt

---

der Pantothen-Kinase vor, der zur Akkumulation unverbrauchten Cysteins führt. Das Cystein bindet Eisen, wodurch es zur Anreicherung des Metalls im Gehirn (und anderen Geweben). NBIA manifestiert sich in der Regel in der ersten Lebensdekade, ist immer progredient und führt meist nach etwa zehn Jahren zum Tode.

### 1.1.3 Kupfer

Kupfer ist als funktionelles Element verschiedener Enzyme ein essentieller Bestandteil der meisten Organismen, selbst Hefe besitzt verschiedene Kupfertransporter und -reduktasen. Kupferspeicherkrankheiten führen zu schweren, zum Teil letalen Krankheitsbildern.

#### Transport/Homöostase

Die tägliche Cu-Aufnahme eines erwachsenen Menschen aus der Nahrung liegt bei etwa 0,75 mg/d. Die Ausscheidung über die Galle beträgt bis zu 4 mg täglich, ein Großteil dieser Menge wird über den enterohepatischen Kreislauf wieder resorbiert.(35)

Den höchsten Kupfergehalt im menschlichen Körper weist das Skelett mit etwa 42% der Gesamtmenge (ca.110mg beim 70kg wiegenden Erwachsenen(36)) auf, nur etwa 6 % entfallen auf das Gehirn.

Die Resorption im Darm erfolgt vermutlich zunächst durch passive, luminale Diffusion. Den (die Aufnahme limitierenden) Weitertransport über die basolaterale Membran übernimmt der ATP-anhängige Transporter *ATP7A*(36).

Versuche mit radioaktiv markiertem Kupfer(37) zeigten, dass es etwa 2 Stunden nach intravenöser Applikation aus dem Blut eliminiert war. 40% des markierten Kupfers waren nach 6 Stunden in der Leber zu finden.

Das intravasale Transportprotein hierfür ist Albumin. Albumin kann bis zu 40mg Kupfer je Liter Blut binden. Die tatsächlich gebundene Menge liegt jedoch deutlich unter 1 mg/l. In der Leber wird Kupfer in Caeruloplasmin eingebaut, das damit das hauptsächliche Transportsystem (~65%) für das Spurenelement ist(35).

---

Zur Regulation des intrazellulären Kupfergehaltes dienen, je nach Lokalisation, zwei Transportproteine:

- *ATP7A*, das je nach Konzentration Cu entweder dem Golgiapparat zuführt oder, bei Überschuss, es in Vesikeln sammelt und so ins Interstitium bzw. die Blutbahn entlassen kann.
- *ATP7B* kommt exklusiv in der Leber vor und dient wie *ATP7A* der intrazellulären Regulation, mit dem Unterschied, dass das Kupfer hier entweder in Caeruloplasmin eingebaut oder über die Gallencanaliculi sezerniert wird(38).

Wichtig für die intrazelluläre Distribution des Kupfers sind sog. Chaperone. Chaperone sind Proteine, die Kupfer jeweils spezifischen Funktionen zuführen. Zu nennen wären hier z.B. *Ccs1* (liefert das Kupfer für die *SOD1*) oder *Cox17* (versorgt mitochondriale Cytochrome).

### Physiologische Funktionen

Wie eingangs erwähnt, ist Kupfer essentieller Bestandteil verschiedener Enzyme, in denen es im reaktiven Zentrum sowohl als Elektronendonator als auch -akzeptor wirken kann. Als wichtiges Beispiel wäre hier z.B. Caeruloplasmin zu nennen, das Eisen von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert und so erst transportfähig macht. Auch Kupfer selbst kann von diesem Enzym von  $\text{Cu}^+$  zu  $\text{Cu}^{2+}$  oxidiert werden(39). Ein weiteres, essentielles Kupferenzym ist die Superoxiddismutase (*SOD1*, *CuZnSOD*), die ein Schlüsselenzym der Radikalbeseitigung darstellt.

### Neurodegeneration

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre legen nahe, dass Kupfer sowohl indirekt, als auch unmittelbar an neurodegenerativen Prozessen bzw. Erkrankungen beteiligt sein könnte.

Beim Morbus Alzheimer (AD) kommt es zur Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden im

---

synaptischen Spalt glutamaterger Synapsen. Diese Peptide werden vom membranständigen Amyloid Precursor Protein (APP) abgespalten. Die zunehmende Anhäufung von A $\beta$  wirkt neurotoxisch, vermutlich durch die Erzeugung freier Radikale, und resultiert letztlich in neuronalem Zelluntergang.

Im A $\beta$ -Peptid befinden sich mehrere Kupferbindungsstellen, was den hohen Kupfergehalt (4,4-fach erhöht in humanen AD-Gehirnen im Vergleich zu Kontrollpräparaten(1)) erklären kann.

A $\beta$ -gebundenes Cu<sup>2+</sup> besitzt die Fähigkeit, oxidativ auf benachbarte Proteine einzuwirken. So kommt es zur Oxidation von z.B. Methionin- oder Tyrosinresten, was häufig mit dem Funktionsverlust der entsprechenden Enzyme einhergeht. Es entstehen teilweise aber auch aggressive Produkte wie Tyrosinradikale. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass A $\beta$ 42 *in vitro* und in der Gegenwart von Cu<sup>2+</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oligomere mit Dityrosinbrücken ausbildet, die nicht proteolytisch gespalten werden können und somit die Entstehung von Plaques fördern(40).

Auch Cholesterin kann mit Hilfe von Kupfer zu 5,6-Epoxid oder 5 $\alpha$ -Hydroperoxid oxidiert werden. Eine prospektive Studie an 3718 Patienten(41) zeigte einen Zusammenhang zwischen erhöhter Kupferzufuhr in Kombination mit fettreicher (gesättigte Fettsäuren) Nahrung auf der einen Seite und Alzheimerinzidenz auf der anderen Seite. Patienten, die sich lediglich kupferreich, aber nicht fettreich ernährten, zeigten keine überdurchschnittlichen, kognitiven Einbußen.

Der Morbus Wilson ist eine Kupferspeicherkrankheit, bei der ebenfalls neurodegenerative Prozesse zu beobachten sind. Hier kommt es zu einer Mutation im Gen für den bereits erwähnten, intrazellulären, hepatischen Kupfertransporter *ATP7B*(35). Als Folge des Defekts kann Kupfer nicht mehr über die Galle ausgeschieden werden. Außerdem ist die Synthese des Caeruloplasmins stark beeinträchtigt. Hierdurch reichert sich (freies) Kupfer im Körper, vor allem in der Leber und im Gehirn, an. Langfristig führt das Kupfer zu Leberschäden und oft durch Ablagerungen in den Basalganglien auch zu einer neurologischen Symptomatik, die sich durch Verhaltensauffälligkeiten und/oder Bewegungsstörungen bemerkbar machen können(42).



---

Beim *Morbus Menke* ist der Transporter *ATP7A* von einer Mutation betroffen. Diese wesentlich seltenere Erkrankung verläuft ungleich schwerer und endet unbehandelt in der Regel letal in den ersten drei Lebensjahren. Der Schweregrad der Erkrankung hängt von der Lokalisation der Mutation im *ATP7A*-Gen ab(38).

Als Folge des Transporterdefekts kommt es zu einem generalisierten Kupfermangel im Körper. Dies betrifft kupferabhängige Enzyme und führt zu Wachstumsstörungen, instabilen Knochen und Bindegewebsdefekten.

Aufgrund der wichtigen Funktion des Kupfers bei der Entwicklung des Nervensystems(43) kann es außerdem zu neurologischen Störungen, wie Krampfanfällen oder verzögerter Sprachentwicklung, kommen. In schweren Fällen führen Gefäßveränderungen früh zu tödlichen Hirnblutungen oder schweren Hirnschäden.

#### 1.1.4 Mangan

Mangan ist das in der Erdkruste am zweithäufigsten vorkommende Schwermetall. In Geweben von Mensch und Tier ist es jedoch nur als Spurenelement anzutreffen. Die normale Konzentration liegt unter 1µg/g Feuchtgewicht(44).

Chemisch besitzt Mangan Ähnlichkeit mit Calcium und Magnesium, weshalb z.B. einige manganhaltige Enzyme auch mit Magnesium funktionstüchtig sind.

Hinweise auf eine Bedeutung des Mangans im cerebralen Stoffwechsel sind z.B. erhöhte Krampfanfälligkeit bei manganfreier Diät und eine starke Anreicherung im ZNS, insbesondere in den Basalganglien, bei überdosierter Zufuhr über die Atemwege oder durch Nahrungsaufnahme. Zu große Mengen Mangan im Körper führen zu einem Syndrom, das als „Manganismus“ bezeichnet wird und in seiner Symptomatik dem Morbus Parkinson sehr ähnlich ist(45).

#### Transport

Direkt nach der Geburt sind die Schrankensysteme des Gehirns (Blut-Hirn-Schranke,

---

BHS; Blut-Liquor-Schranke, BLS) noch nicht voll ausgebildet. Bis etwa zum vierten Lebensmonat (beim Menschen) ist insbesondere die BHS relativ durchlässig für Mangan in freier, wie auch in proteingebundener Form(44). Die gesteigerte Durchlässigkeit für höhermolekulare Teilchen scheint für das zu dieser Zeit enorme Wachstum des Gehirns wichtig zu sein. Später wird der zentrale Manganhaushalt durch eben diese Barrieren exakt geregelt.

Oral aufgenommenes Mn gelangt zunächst zur Leber, wo es vom Caeruloplasmin von der zwei- zur dreiwertigen Form oxidiert werden kann. Dreiwertiges Mangan kann vom Eisentransporter Transferrin gebunden werden. Auf der Oberfläche des Kapillarendothels des Gehirns finden sich Transferrin-Rezeptoren, was vermuten lässt, dass Mn per Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Endothelzellen gelangt. Bezüglich des Transports von Transferrin-gebundenem Eisen (und somit auch Mangan) existieren zwei Theorien:

- Transferrin wird in der Endothelzelle von seinen Metallen „befreit“ und danach zurück ins Plasma abgegeben. Die Metalle werden auf noch unbekanntem Wege ins Interstitium befördert.
- Transferrin wird unverändert per Transzytose ins Interstitium befördert.

Der Transport der zweiwertigen Form des Metalls scheint über den schon erwähnten *DMT -1* möglich zu sein, der sich sowohl im Kapillarendothel als auch in den Zellen des Plexus Choroideus finden lässt.

Die Aufnahme in Neurone geschieht offenbar ebenso über Transferrinrezeptoren, die sich auf diesen Zellen nachweisen lassen. Da ein Mn-spezifischer Transporter bislang nicht identifiziert werden konnte, wird angenommen, dass freies Mn, zumindest in seiner zweiwertigen Form, über den hier ebenfalls nachweisbaren *DMT-1* aufgenommen wird.

---

### Physiologische Funktionen

Die Funktionen von Mn im ZNS scheinen vielfältig zu sein, ihre Erforschung steht allerdings erst am Anfang.

Als Bestandteil der Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) ist es am Abfangen freier Radikale beteiligt. Andere manganhaltige Enzyme sind die Pyruvatcarboxylase oder die Glutaminsynthetase(46). Weiterhin beschrieben Takeda et al.(44), dass die Freisetzung von Mn in einigen Bereichen des ZNS (z.B. des Hippocampus) nach Stimulation durch hohe Kalium-Konzentrationen sehr eng mit der Freisetzung von Glutamat korrelierte. Wie beim Zink, lässt sich auch hier ein Co-Release aus glutamatergen Neuronen schlussfolgern.

Bei Perfusion von hippocampalem Gewebe mit erhöhten Dosen von  $MnCl_2$  (20-200 nM/l) zeigte sich, dass die Konzentrationen von Aspartat, Glutamat und GABA im Perfusat dosisabhängig absanken. Zudem ist bekannt, dass bivalente Kationen wie Zink, Cadmium, Kobalt und auch Mangan in der Lage sind, spannungsabhängige  $Ca^{2+}$  Kanäle zu blockieren sowie AP-induzierte Neurotransmitter-Freisetzung zu inhibieren(44).

Hieraus könnte man schlussfolgern, dass Mangan, das aus glutamatergen Nervenendigungen freigesetzt wird, dazu beiträgt, benachbarte Neurone zu hemmen.

### Neurotoxizität

Wie aufgeführt, reichert sich Mangan schnell im Gehirn, insbesondere in den Basalganglien an. Der resultierende Manganismus tritt z.B. bei Minenarbeitern oder Arbeitern in Batteriefabriken (Alkali-Mangan-Batterie) gehäuft auf. Das Syndrom zeichnet sich durch parkinsonoide Symptome wie Dystonie, Bradykinesie und Rigor aus. Im Vergleich zum M. Parkinson ist die Frequenz des Ruhetremors erniedrigt, der Grad der Dystonie erhöht und die Substitution von L-Dopa zeigt keine anhaltende Wirkung(47), was angesichts der unterschiedlichen Pathogenese nicht überrascht.

Mangan erhöht indirekt die Konzentration oxidativer Substanzen durch Absenken des Gehalts an Peroxidase und Katalase in der Substantia Nigra, außerdem bewirkt es die Produktion toxischer Katecholamine wie 6-Hydroxydopamin (6-OHDA).

---

In vitro-Experimente an Motoneuronen von Fröschen lassen vermuten, dass Mn in der Lage ist, durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle zu diffundieren, was zu einer gesteigerten Freisetzung von Neurotransmittern führt.

Ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Mangan und Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson konnte bislang nicht festgestellt werden.

## 1.2 Die Lurcher Mutante

Die *Lurcher* Mutante ist eine durch eine genetische Spontanmutation ataktische Maus, die heute als Modell für neurodegenerative Erkrankungen verwendet wird.

Erstbeschreiber der *Lurcher* Mutante war Phillips im Jahre 1960 (48). Die Mutation führt in den ersten Lebenswochen zu einem vollständigen (>99%) Verlust der cerebellären Purkinje-Zellen (PC) und zum Untergang von 90% der Körnerzellen (GC).

Nachfolgende Untersuchungen zeigten darüberhinaus einen Verlust von 75% der Neurone der unteren Olive(49) und 30 % der Nervenzellen in den Kleinhirnkernen (50). Der Untergang dieser Zellen scheint sekundäre Folge der mangelnden trophischen Stimulation durch Wegfall der Purkinjezell-Innervation zu sein(51) was später durch Versuche an *Lc/Bax*<sup>-/-</sup> Mutanten untermauert werden konnte. Das *Bax*-Gen gehört zur BCL-2 Familie, wirkt pro-apoptotisch und wurde hier per Knock-Out inaktiviert. In *Lc/Bax*<sup>-/-</sup> Mutanten war der Körnerzellverlust halbiert, während der Verlust der PCs unverändert blieb(52). Lebensfähig sind nur die heterozygoten Tiere (*Lc/+*). Homozygote (*Lc/Lc*) Mutanten sterben perinatal in Folge einer massiven Degeneration von Hirnstamm-Neuronen.

Das für die Mutation verantwortliche Gen konnte als *Grid2*-Gen identifiziert werden, und ist auf Chromosom 6 lokalisiert. Es codiert für den ionotropen Glutamat Rezeptor *GluRd2* (53), der vor allem in den PCs exprimiert wird(54)

Die Mutation führt zu einer Daueraktivierung des Ionenkanals und dadurch zu einem persistierenden Einstrom von Kationen in die Zelle. Der Rezeptor ist ein „Orphan-Rezeptor“. Dies bedeutet, dass er strukturell einer bestimmten Rezeptorengruppe

---

zugeordnet werden kann (in diesem Fall den Glutamat-Rezeptoren), jedoch nicht auf den jeweiligen Liganden reagiert.

Versuche mit „Hotfoot“ Mutanten (GluRd2<sup>Ho/Ho</sup>) konnten zeigen, dass der Rezeptor dennoch wichtige Funktionen erfüllt. Die Hotfoot-Mutation bewirkt, dass GluRd2 zwar synthetisiert, aber nicht in die Zellmembran eingebaut wird. Morphologisch zeigen sich hier (im Gegensatz zu *Lurcher*) zunächst keine Auffälligkeiten, die Entwicklung des Kleinhirns verläuft normal. Es kommt nicht zu makroskopisch sichtbarer Degeneration von Zellen(55). Gleiches gilt für GluRd2 KnockOut Mäuse (GluRd2<sup>-/-</sup>), bei denen das Gen für den Rezeptor nicht vorhanden ist. Dennoch zeigen die Tiere Zeichen eines cerebellären Defektes, sind ataktisch und motorisch beeinträchtigt. Genauere, ultrastrukturelle und elektrophysiologische Untersuchungen zeigen Veränderungen im Bereich der Synapsen zwischen PCs und Parallelfasern(PF)(56) sowie zwischen PCs und Kletterfasern (CF)(55). Die Zahl der Synapsen war hier deutlich reduziert, was den Phänotyp zumindest teilweise erklärt.

Ohne einen Hinweis auf den Liganden bleibt die Funktion des Proteins im Wildtyp weitgehend unklar, verschiedene Modelle werden derzeit diskutiert(57). Obwohl der zeitliche Verlauf und die Morphologie des Zelluntergangs in *Lurcher* und die genetische Mutation mit ihren strukturellen Folgen weitestgehend aufgeklärt sind, konnten die direkten Mechanismen für den Zelltod bis heute nicht zweifelsfrei geklärt werden. Nachdem lange angenommen wurde, dass es sich um einen primär apoptotischen Prozess infolge der dauerhaften, exzessiven Stimulation der Zelle (Exzitotoxis) handelt, gibt es nunmehr weitere Befunde, die auch andere Zelltodmechanismen einschließen.

Eine dieser Hypothesen legt nahe, dass es sich bei diesem Zelluntergang um Autophagie handeln könnte. Zum Abbau größerer Proteinkomplexe oder ganzer Organellen können Zellen sogenannte Autophagosomen bilden. Dabei werden die abzubauenen Komplexe zunächst in Doppel-Lipidmembranen eingeschlossen. Diese Autophagosomen fusionieren nun mit Lysosomen wodurch der Inhalt unter sauren Bedingungen abgebaut oder zumindest verkleinert wird, um später in Proteasomen abgebaut werden zu können(58).

Unter Stressbedingungen wie Substratmangel, aber auch bei verschiedenen

---

neurodegenerativen Erkrankungen, kann es in den betroffenen Zellen zu Ansammlungen von Autophagosomen kommen. Da Autophagie einen physiologischen Recycling-Prozess darstellt, lässt sich aber aus der vermehrten Präsenz von Autophagosomen kein kausaler Zusammenhang zum Zelltod herleiten(58).

In *Lc/+* Purkinjezellen lassen sich zahlreiche Autophagosomen nachweisen. Darüberhinaus wurde 2001 von Yue et al.(59) gezeigt, dass Beclin1, ein essentieller Bestandteil der autophagischen Signalkaskade, mit dem GluRd2 Rezeptor interagiert. Die pharmakologische Inaktivierung von *Beclin1* mit 3-Methyladenin konnte *in vitro* einen Teil der PCs vor dem Untergang bewahren. Allerdings blockiert diese Substanz auch apoptotische Signalwege(60).

In einigen sterbenden *Lc/+* - PCs kommt es neben vermehrter Autophagosomenbildung auch zur Aktivierung der *Caspase-3*, einem Schlüsselenzym der Apoptosekaskade. Eine größere Fraktion der *Lc/+* PCs wird im Verlauf der Degeneration positiv für Fluor Jade-B, einem Zelltodmarker, der auch nekrotische Neurone identifiziert. Darüberhinaus kommt es zur mitochondrialen Cytochrom-C Freisetzung, die ein starkes Indiz für mitochondriale Fehlfunktion darstellt.

Die aktuelle Datenlage deutet demzufolge also eher darauf hin, dass die metabolische Überlastung der chronisch depolarisierten PC's zur parallelen Aktivierung verschiedener Zelltodkaskaden und Schutzmechanismen führt(61).

Hohe metabolische Aktivität führt zu vermehrter Radikalproduktion. Spurenelemente nehmen eine zentrale Rolle sowohl bei der Radikalbeseitigung als auch bei der Radikalentstehung durch verstärkten Energiestoffwechsel ein. Die Aufklärung der Funktion der Spurenelemente im Verlauf der PC-Degeneration in *Lc/+* Mutanten besitzt dadurch Modellcharakter, auch für menschliche, neurodegenerative Erkrankungen. Das Leitmotiv der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zu dieser Aufklärung durch subzelluläre Lokalisation einzelner Spurenelemente in sterbenden PCs zu leisten.

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere waren Wildtyp (+/+) Mäuse (B6CBA) und heterozygote *Lurcher* Mutanten (*Lc/+*), Zuchtpaare dieser beiden Stämme wurden von den Jackson Laboratories in Bar Harbor, ME, USA bezogen und die Filialgenerationen in der Tierhaltung des Instituts für Physiologie gehalten.

Die Tiere waren einem 12 Stunden Tages- und Nachtrhythmus unterworfen und bekamen identisches Standardfutter und Wasser ad libitum im Tierstall der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

Die Tierhaltung, Zucht und sämtliche Eingriffe an den Versuchstieren waren durch die regionale Aufsichtsbehörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin ) begutachtet und genehmigt (Aktenzeichen L0287/93, 1993)

und entsprachen den Richtlinien des Tierschutzgesetzes und des National Institute of Health (NIH).

	+/+	Lc/+
p7	3	4
p14	1	2
p15	1	1
p19	1	-
p20	-	1
p22	2	2
p24	2	1
p29	1	1
p83	1	1
p120	1	-
p125	-	1
Summe	13	14

**Tabelle 2: Übersicht Versuchstiere**

#### 2.1.1 Anzahl

Da sich die Degeneration der PCs im *Lc/+* Cerebellum über den Zeitraum der ersten vier postnatalen Wochen erstreckt und das primäre Interesse auf den Veränderungen der Spurenelementkonzentrationen und -verteilungen innerhalb dieses Zeitraums gerichtet war, wurde vor allem darauf geachtet, die Abtastrate innerhalb dieser Zeitreihe so eng wie möglich zu halten. Die Anzahl der untersuchten Tiere zu jedem Zeitpunkt wurde dadurch relativ niedrig und wird statistischen Anforderungen an die Mindestanzahl der Stichprobe je Altersstufe nicht gerecht. Weitere Gründe für die Entscheidung zugunsten einer engen Abtastrate waren:

- 
1. Stichproben mit höherer Anzahl je Altersstufe (p7,p22) zeigten keinerlei erkennbare, interindividuelle Unterschiede bei Tieren gleichen Alters
  2. Eine Quantifizierung bez. der Färbeintensitäten erschien aufgrund der Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Timm-Färbung als wenig sinnvoll. Die Untersuchungen zur Zn-Verteilung mit der Timm-Methode waren vor allem qualitativer Natur. Mögliche Veränderungen der Lokalisation von Zn innerhalb der Zellpopulationen während des Verlaufs der Degeneration sollten durch diesen Ansatz aufgedeckt werden.

### 2.1.2 Genotypisierung

Da die Identifizierung anhand cerebellärer Ataxie erst ab etwa p15 sicher gelingt, wurden alle Tiere, die 15 oder weniger Tage alt waren, zusätzlich genotypisiert. Gleiches gilt für die Proben, die mit der SXRF Methode analysiert wurden. Die Genotypisierung wurde von einer Mitarbeiterin unserer Arbeitsgruppe anhand eines etablierten Protokolls durchgeführt(62).

### 2.1.3 Präparation

Alle Tiere wurden dekapitiert und die Hirne schnellstmöglich entnommen, um die Hypoxiezeit kurz zu halten. Die Hirne wurden dann auf einer in flüssigem Stickstoff schwimmenden Aluminiumschale eingefroren. Die Zeit zwischen Dekapitation und Einfrieren betrug maximal fünf Minuten.

Die Schnitte wurden in einem Kryostaten Jung/Leica CM 3000 angefertigt. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Objekttemperatur von -16°C und einer Kammertemperatur von -25°C erzielt. Die Schnittdicke lag bei 10µm für die Timm- und bei 8µm für die Synchrotronpräparate.



---

#### 2.1.4 Timm Färbung

Zur histologischen Darstellung von Zink wurde die sog. Immersions AMG Methode leicht modifiziert angewendet.

Die Immersions AMG Methode geht auf F. Timm zurück, der 1961 ein Verfahren entwickelte, um verschiedene Metalle im menschlichen Gehirn nachzuweisen(63). Grundlegendes Prinzip der sog. Autometallographie ist die Erzeugung metallischer Salze aus im Gewebe enthaltenen Metallen und Schwefel. Die Salze bilden katalytische Nanokristalle, die aufgrund ihrer geringen Größe zunächst nicht dargestellt werden können.

Im zweiten, dem Entwicklungsschritt, werden die Kristalle gefärbt und vor allem vergrößert. Die hierfür erforderlichen Bestandteile des Entwicklers sind ein Reduktionsmittel (Hydrochinon) und eine Färbesubstanz (Silberionen).

Die Silberionen binden an die Nanokristalle und werden reduziert, wobei sie die katalytische Funktion übernehmen. Auf diese Weise können sich weitere Silberionen anlagern. Solange Silber- und Elektronenquelle ausreichend vorhanden sind, lässt sich die Reaktion beliebig fortsetzen, eine Sättigung oder ein Ende der Entwicklung treten nicht ein. Dies ist einer der Hauptgründe dafür, dass exakt auf die Reaktionsbedingungen geachtet und das Ergebnis während der Entwicklung beobachtet werden muss. Die Reaktion läuft zudem nicht zeitlich linear ab, da größere Kristalle mehr Silberionen pro Zeiteinheit reduzieren.

Die Sensitivität der Methode ist extrem hoch – bereits einige Zinkatome reichen aus, um eine Färbung zu erzeugen. Durch diese hohe Empfindlichkeit steigt andererseits auch das Risiko einer unspezifischen Färbung (Autokatalyse freier Silberionen), so dass mit größter Sorgfalt (z.B. in Bezug auf die Reinheit der verwendeten Utensilien und Reagenzien, Reaktionstemperatur und -zeit) gearbeitet werden muss.

Der erste Schritt – die Erzeugung der Salze mit Hilfe von Schwefel – war in Timms Protokoll noch sehr aufwendig und nicht ungefährlich. Die Proben wurden in einer Kammer Schwefeldämpfen ausgesetzt, was die Penetration des Schwefels in tiefere Regionen (im Vergleich zur Perfusions- oder Immersionsmethode) der Probe

---

erschwerte.

In den 80er Jahren entwickelte Gorm Danscher die Methode weiter und entwarf u.a. Protokolle für die Perfusion von Mäusen mit Natriumsulfit und die Immersion un behandelter Schnitte. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Protokolle wurden Danschers Übersichtsarbeit aus dem Jahre 2006 entnommen(64)

## 2.2 Die Immersions-Autometallographie-Methode (AMG)

Für die Untersuchung der cerebellären Zinkverteilung wurde die folgende Abwandlung der Timm-Methode ausgewählt. Die Vorteile gegenüber der alternativen NeoTimm-Methode (Perfusion der Tiere) sind die schnellere Präparation und das Wegfallen des Risikos einer unzureichenden Perfusion. Da außerdem mit nur 10µm dicken Schnitten gearbeitet wurde, bestand auch nicht die Gefahr einer mangelhaften Penetration des Schwefels.

### Immersion

- Inkubation der Schnitte in 0,1 M Phosphatpuffer mit 3% Glutaraldehyd und 0,1 % Na<sub>2</sub>S bei 4°C für 24h
- 2x Waschen für 10 min. in 0,1 M Phosphatpuffer

Abweichend von Danschers Protokoll wurde lediglich 24h (anstatt 72h) inkubiert. Versuche mit 48 bzw. 72h Inkubationszeit zeigten keine sichtbaren Unterschiede. Das ursprüngliche Protokoll geht von wesentlich dickeren Schnitten aus.

### Reagenzien

- Gummi Arabicum  
500g Gummi Arabicum (SIGMA), bei 40 °C in 1l Aqua Dest gelöst und in Portionen von je 120 ml bei -20°C eingefroren

- 
- Citratpuffer  
5,1 g Citronensäure  
4,7 g Natriumcitrat-Dihydrat  
ph 3,7
  - Hydrochinonlösung  
1,7 g Hydrochinon bei 40°C gelöst in  
30 ml Aqua Dest.
  - Silberlaktatlösung  
0,24 g Silberlaktat bei 40°C lichtgeschützt gelöst in  
30 ml Aqua Dest.

### Entwicklung

- 120 ml Gummi Arabicum Lösung
- 20 ml Citratpuffer
- 30 ml Hydrochinonlösung
- 30 ml Silberlactatlösung
- 17-23 min. Entwicklung unter Lichtschutz
- Stoppen der Reaktion in 10% Natriumthiosulphatlösung für 10 min
- 10 min. Spülen unter fließendem Wasser
- Alkoholreihe (70%, 90%, 2x100% EtOH, 2x Xylol, jeweils 5 min.)
- Eindeckeln

### Farmer Solution

900 ml Natriumthiosulphat 10%

100 ml Kaliumhexacyanoferrat 10%

---

Die Entwicklung wurde grundsätzlich lichtgeschützt und bei Raumtemperatur durchgeführt. Da die Intensität der Färbung bei gleicher Entwicklungszeit teilweise variierte, wurde nach Sicht entwickelt. Die Zeiten variierten zwischen 17 und 23 Minuten, was möglicherweise auf eine leicht schwankende Raumtemperatur zurückzuführen war.

Als Positivkontrolle wurde – wie von Danscher empfohlen – die makroskopisch sichtbare Färbung der Hippocampi herangezogen. Zur Negativkontrolle wurde jeweils ein Objektträger nicht in  $\text{Na}_2\text{S}$  + Glutaraldehyd, sondern nur in 0,1M Phosphatpuffer inkubiert.

Alle Glasgegenstände wurden vor ihrer Verwendung 30 min. in Farmer Solution von metallischen Rückständen befreit und danach mit Aqua Dest gespült.

## **2.3 Röntgen-Fluoreszenz-Spektrometrie (SXRFS)**

Der zweite Ansatz zur Untersuchung der Spurenelemente war die Nutzung von Synchrotronstrahlung. Ziel war es, die gegebenen Limitationen der Timm-Methode zu umgehen und darüberhinaus in der Lage zu sein, auch andere Elemente wie Kupfer, Eisen und Mangan zu untersuchen, sowie einen Einblick in die subzelluläre Verteilung dieser Elemente zu gewinnen.

### *2.3.1 Synchrotronstrahlung*

Synchrotronstrahlung entsteht, wenn geladene Teilchen bei hoher Geschwindigkeit abgelenkt werden. Der Effekt wurde 1949 erstmalig von Julian Schwinger beschrieben (65).

Was zunächst als „Abfallprodukt“ der ersten Teilchenbeschleuniger bewertet wurde, entwickelte sich später zu einer Strahlenquelle mit zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten, so dass man schließlich Speicherringe konstruierte, deren einziger Zweck die Erzeugung eben dieser Strahlung ist.

---

Synchrotronstrahlung zeichnet sich durch verschiedene vorteilhafte Eigenschaften gegenüber herkömmlich erzeugter Röntgen- bzw. Gammastrahlung aus:

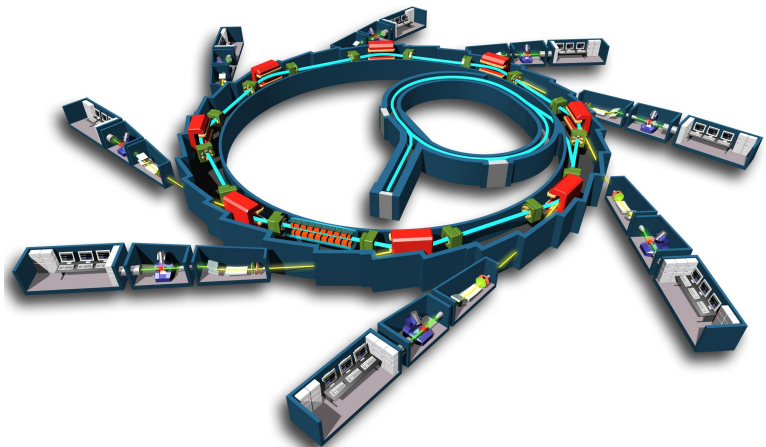
- strenge Polarisierung in der Ebene des Speicherrings (horizontal)
- hohe Strahlintensität
- sehr breites, kontinuierliches Spektrum vom infraroten über den ultravioletten bis weit in den Bereich der Röntgenstrahlung
- exakte Berechenbarkeit des abgegebenen Spektrums
- hohe Brillanz des abgegebenen Lichts

### 2.3.2 Speicherring

Die für die Versuche verwendete Strahlung wurde in den Speicherringen BESSY in Berlin und ESRF in Grenoble erzeugt.

In einem Ring von 240m (BESSY) bzw. 269m (ESRF) Durchmesser werden zunächst von einer

Elektronenquelle freie Elektronen erzeugt. Diese werden dann durch einen Teilchenbeschleuniger und einen Beschleunigerring beschleunigt, bis sie annähernd Lichtgeschwindigkeit erreichen. Danach werden die hochenergetischen Teilchen in den Speicherring eingeleitet, wo sie im Ultravakuum für mehrere Stunden auf einer Kreisbahn gehalten werden können. Auf den Strecken zwischen den einzelnen Ablenkmagneten befinden sich sog. „Wiggler“, die die Elektronen in der Kreisebene in Schwingung versetzen. Dabei entsteht die Synchrotronstrahlung, die tangential abgegeben wird und an den sog. Beamlines genutzt wird. Letztere sind



**Abbildung 2.3.1: Schema des Synchrotron Soleil. Quelle: EPSIM 3D/JF Santarelli, Synchrotron Soleil**

---

strahlenabgeschirmte Räume bzw. Hütten in der Speicherringhalle, in der sich die jeweiligen Versuchsaufbauten befinden, die sich – je nach Anwendung – stark unterscheiden können. Der Elektronenfluss innerhalb des Speicherrings und damit die Strahlintensität nimmt mit der Zeit kontinuierlich ab, da stetig Elektronen mit verbliebenen Molekülen im Vakuum kollidieren. Aus diesem Grund gibt in circa achtstündigen Intervallen eine sog. „Injektion“ von Elektronen, bei der die Stromstärke (max 200 mA) wieder erhöht wird.

Für unsere Experimente waren zusätzlich ein Monochromator, der die gewünschte Wellenlänge aus der erzeugten Strahlung herausfilterte, sowie ein Kollimator zur Parallelisierung der einfallenden Strahlen, erforderlich.

Trifft der Strahl auf ein Atom in der Probe, wird durch die Kollisionsenergie ein Elektron der inneren Schale herausgeschlagen. Ein Elektron aus einer höheren Schale nimmt daraufhin den freigewordenen Platz ein – und emittiert dabei ein Photon. Die Wellenlänge ist abhängig von der Differenz der Bindungsenergien der beiden Schalen. Da die Bindungsenergien von der Kernladung abhängen, ergibt sich so ein spezifisches Emissionsspektrum für jedes Element. Die Detektion erfolgte mittels eines energiedispersiven Röntgen-Fluoreszenzspektrometers.

### *2.3.3 Probenpräparation*

Für die Messungen im Synchrotron wurden jeweils ein Wildtyp- und ein Lurchergehirn gewählt. Beide wurden an p18 entnommen, da dies zeitlich der Höhepunkt des PC-Untergangs ist.

Durch die extreme Sensitivität der Synchrotronmessungen mussten die Proben mit großer Sorgfalt hergestellt werden, um jegliche Kontamination zu vermeiden. Dies beinhaltete unter anderem die Verwendung von Titaninstrumenten bei der Präparation und den kompletten Verzicht auf Perfusions-, Spülungs- oder Fixationslösungen, da

---

diese nicht in dem erforderlichen Reinheitsgrad zur Verfügung standen.

Die angefertigten Kryoschnitte mussten aufgrund des Versuchsaufbaus so dünn wie möglich sein. Die kleinste, reproduzierbare Schichtdicke war 8µm.

Die Schnitte wurden in Dreierserien geschnitten, wobei der Messschnitt jeweils zwischen seinen beiden Nachbarschnitten lag. War ein Schnitt innerhalb einer Dreierserie unbrauchbar, wurden alle Schnitte dieser Serie verworfen. Die Messschnitte wurden auf eine spezielle, in Diarähmchen gespannte Folie aufgezogen (Mylar®, Dupont), die jeweiligen Nachbarschnitte auf Microm SuperFrost PLUS® Objektträger.

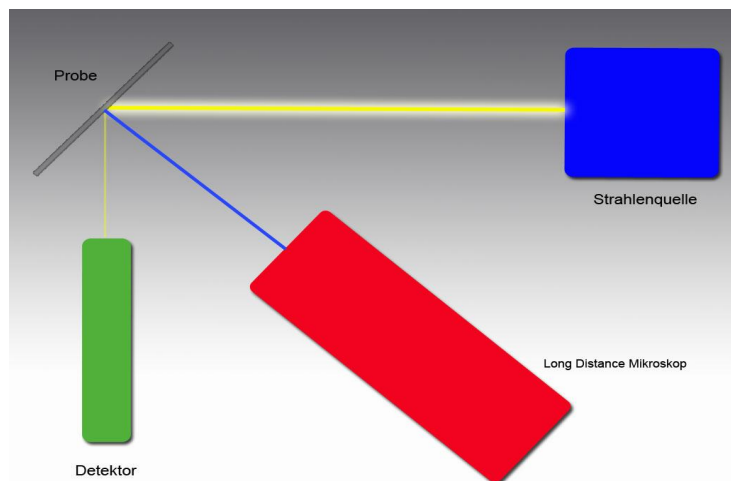
### 2.3.4 Versuchsaufbau

Die vier wichtigsten Elemente des Versuchsaufbaus sind die Strahlenquelle, die Probe, das Long Distance Mikroskop und der Detektor, wobei die räumliche Anordnung im Hinblick auf Ortsauflösung und Fokussierung des Strahls eine große Rolle spielt.

Es ist technisch nicht möglich, den Detektor hinter der Probe zu

positionieren, denn er wäre dann direkt im Strahlengang. Aus diesem Grund muss eine Anordnung gewählt werden, die die Strecke, die der Strahl im Gewebe zurücklegt, klein hält. Je weiter die Abweichung vom idealen, senkrechten Winkel ist, desto mehr Gewebe wird angeregt und desto geringer wird dadurch die Ortsauflösung. Dies ist auch der Grund dafür, dass die Schnitte so dünn wie möglich gehalten werden müssen.

Da der Einstrahlwinkel gleich dem Ausstrahlwinkel ist, und sowohl der Detektor als auch der Kollimator eine gewisse Größe besitzen, kann der Einstrahlwinkel nicht beliebig klein gewählt werden. 45° erwiesen sich hier als praktikable Lösung, da dies die



**Abbildung 2.3.2: Versuchsaufbau Synchrotron**

---

Positionierung und Fokussierung der Probe erleichtert.

Das Mikroskop „blickt“ in dieser Anordnung senkrecht auf die Probe, wodurch immer das gesamte Blickfeld im Fokus ist.

### 2.3.5 *Fokussierung und Scandauer*

Die Fokussierung des Strahls gelang bei den durchgeführten Messungen bis auf 150nm Punktdurchmesser. Limitierend wirken hier verschiedene Faktoren wie minimal mögliche Stellweite der die Probe bewegenden Schrittmotoren, die verwendete Optik und vor allem die zur Verfügung stehende Zeit. Um einen ausreichenden Signal-/Rauschabstand zu erzielen, benötigt man eine bestimmte Mindestzeit pro Punkt. Diese wird durch das am niedrigsten konzentrierte Element, in unserem Fall das Mangan, determiniert. Erhöht man die Auflösung, erhöht sich die Anzahl der Messpunkte, während gleichzeitig die Messdauer pro Punkt ebenfalls ansteigt. Wir wählten eine Punktmesszeit von 1,5s, was einer Gesamtmessdauer von ca. 20h (Wildtyp) bzw. 27,5h (*Lurcher*) entsprach.

Obleich der Synchrotronstrahl stark gebündelt und parallelisiert ist, ist es dennoch erforderlich, die Probe zusätzlich am Ort der höchsten Fokussierung zu positionieren. Hierzu montiert man im Probenhalter einen speziellen Kristall, der bei aktiviertem Strahl im sichtbaren Bereich fluoresziert. Dann wird der Halter in Z-Richtung (Achse durch Probe und Mikroskop) so lange verstellt, bis der maximale Fokus erreicht ist. Nun kann die Probe wieder platziert werden, wobei es wichtig ist, die Position in der Z-Achse nun nicht mehr zu verändern. Die Probe kann in x- und y- Richtung beliebig bewegt werden (um die gewünschte Region anzufahren), ohne den Fokus zu beeinträchtigen.

### 2.3.6 *Auswahl des zu scannenden Bereichs (ROI=Region of interest)*

Da die Präparate aus Kontaminationsgründen nicht gefärbt werden können, ergibt sich als Folge das Problem, dass später auf einem gänzlich ungefärbten Schnitt die gewünschte Messregion, bzw. eine bestimmte Zelle identifiziert werden muss. Überdies



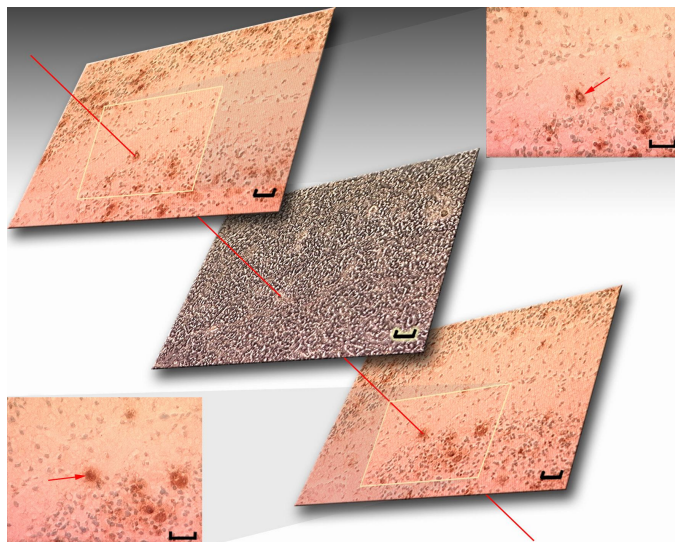
hatte das verwendete Long Distance Mikroskop in unserem Falle nur eine feste Vergrößerungsstufe (20x), was das Auffinden bestimmter Bereiche zusätzlich erschwerte.

Um dennoch in der Lage zu sein, andere histologische Methoden wie die Timm- oder TUNEL(66) Färbung anzuwenden und später auch einzelne, markierte Zellen im Messschnitt wiederzufinden, wurde die „Sandwich“-Methode“ entwickelt.

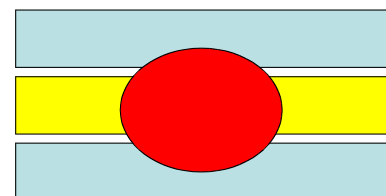
Zunächst ist es notwendig, drei serielle Schnitte von minimaler Dicke (8µm) herzustellen. Wie bereits erwähnt, ist der jeweils mittlere Schnitt der Messschnitt. An den beiden Nachbarschnitten wurden nun mit Hilfe der TUNEL-Färbung apoptotische Zellen markiert. Anschließend wurden PCs gesucht, deren Anschnitte in allen drei Schnitten vorhanden waren.

### 2.3.7 Sandwich-Methode

Da der Durchmesser von Purkinjezellen im Gehirn der Maus bei etwa 8-20µm liegt, kann davon ausgegangen werden, dass bei der Herstellung dreier serieller, 8µm dicker Schnitte Teile des Zellkörpers einiger PCs in allen



**Abbildung 2.3.4: "Sandwich" aus drei seriellen Schnitten. Die Pfeile markieren die untersuchte, TUNEL-positive Zelle. Übersichtsaufnahmen mit vergrößerten Ausschnitten, Scalebars 50µm**



**Abbildung 2.3.3: Schema Sandwichmethode. Gelb: Messschnitt ; Blau: Nachbarschnitte ; Rot: Purkinjezelle**

drei Schnitten verteilt sind. Zur zweifelsfreien Identifikation und Untersuchung einzelner, sterbender, PCs im Synchrotron war es also erforderlich, TUNEL-positive Zellen an der gleichen Position in den beiden äußeren Schnitten einer Dreierserie zu finden. Bei PCs, die diese Kriterien erfüllen, muss der Großteil des Zellkörpers genau im Messschnitt liegen.

---

Da die Dichte der TUNEL-positiven Zellen relativ gering ist, ist es extrem unwahrscheinlich, dass in den beiden äußeren Schnitten zwei verschiedene Zellen an exakt gleicher Position liegen.

Zum Auffinden dieser Konstellationen wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Schnitte in Adobe Photoshop CS2 übereinandergelegt und mit Hilfe histologischer Landmarken, wie z.B. Blutgefäßen, zur Deckung gebracht. Wie erwartet war die gewünschte Konstellation äußerst selten.

Die Messschnitte wurden dunkelfeldmikroskopisch fotografiert und durch das gleiche Verfahren mit den Nachbarschnitten zur Deckung gebracht. Abbildung 2.3.4 zeigt exemplarisch ein solches „Sandwich“.

### 2.3.8 Datenerfassung

Die in die Probe eintretende, hochenergetische Röntgenstrahlung regt die dort befindlichen Atome zur Emission von Röntgenfluoreszenz an, die abhängig vom angeregten Element, aus Photonen unterschiedlicher Wellenlängen besteht.

Der Detektor zählt die durchlaufenden Photonen der verschiedenen Wellenlängen je Messpunkt. Jeder Punkt besteht dadurch aus einem Datensatz mit vielen „Counts“, die den jeweils registrierten Photonen pro Wellenlängenbereich entsprechen.

Die graphische Darstellung der Counts *je Wellenlänge* ergibt ein Emissionsspektrum in dem die einzelnen Elemente durch ihre spezifische und bekannte Lage im Wellenlängenbereich identifiziert werden und isoliert werden können. Die Anzahl der Counts entspricht dabei den relativen Konzentrationen des entsprechenden Elements.

Diese Rohdaten sind zunächst nur von bedingter Aussagekraft. Da der Detektor das Spektrum in Intervalle einteilt, erzeugen Photonen einer bestimmten Wellenlänge nicht nur Counts in „ihrem“ Frequenzintervall, sondern auch in den benachbarten. Aus diesem Grund müssen die Daten nachbearbeitet werden. Darüberhinaus sind die Spektren der verschiedenen Elemente auch unterschiedlich geformt (schmal/breit) und

---

die Peaks besitzen unterschiedliche Flankensteilheiten, teilweise sind auch mehrere Peaks je Element vorhanden.

In einem aufwendigen mathematischen Prozess werden die Counts den einzelnen Elementen zugeordnet (sog. „Fitting“). Zusätzlich müssen die Daten auf den Strahlstrom normalisiert werden, da die Strahlintensität zwischen den Injektionen und damit auch die durchschnittliche Countzahl kontinuierlich abnimmt. Als Standard verwendet man entweder die Strahlenergie, die für jeden Messpunkt gemeinsam mit den Counts gespeichert wird, selbst (hier angewendet) oder den stets sichtbaren Peak des Argons aus der Umgebungsluft.

Fitting und Normalisierung werden für jeden gescannten Punkt einzeln vorgenommen. Zusammen mit den Koordinaten der einzelnen Punkte lässt sich dann eine zweidimensionale Grafik erzeugen in der die Anzahl der Counts in Farben bzw. Farbintensitäten codiert ist.

Diese Berechnungen wurden mit der freien Software PyMCA 4.3.0 durchgeführt, wobei zunächst von unserem Beamline-Scientist für jede Probe Konfigurationsdateien erstellt wurden, mit deren Hilfe der Fittingprozess dann automatisch ausgeführt werden konnte. Resultat dieses Prozesses waren TIF-Bilddateien, mit denen die im Folgenden beschriebenen Analysen durchgeführt wurden.

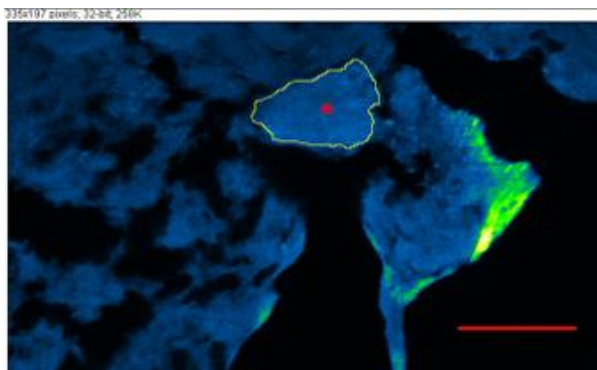
### 2.3.9 Bildanalyse mit ImageJ

Für jedes Element wurde eine Datei erzeugt, wobei die Helligkeitswerte der einzelnen Pixel proportional zur Konzentration des jeweiligen Elements an diesem Punkt waren.

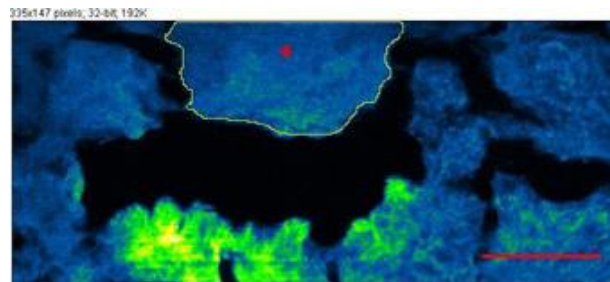
ImageJ bietet vielfältige Optionen zur Bildanalyse (= Measurements). Die Folgenden wurden ausgewählt:

- Label : Benennung des jeweiligen Bildes oder Bildausschnittes
- Area: Größe des analysierten Areals in Pixel
- Mean: Durchschnittlicher Helligkeitswert im Areal, proportional zur Konzentration des Elements
- StdDev: Standardabweichung vom Mean-Wert

- Mode: Am häufigsten vorkommender Helligkeitswert
- Min: Kleinster Helligkeitswert
- Max: Größter Helligkeitswert
- IntDen: Summe aller Helligkeitswerte im analysierten Areal. Proportional zur Masse des untersuchten Elements



**Abbildung 2.3.5: Auswahlmaske am Beispiel Zinkdarstellung, \* = Lc/+ - PC, Scalebar 10µm**



**Abbildung 2.3.6: Auswahlmaske am Beispiel Zinkdarstellung, \* = Wildtyp-PC, Scalebar 10µm**

Diese Daten wurden zunächst für alle Bilder jeweils für das gesamte gemessene Areal erhoben. Anschließend wurden mit Hilfe der beiden Zink-Bilder Auswahlmasken für die zu untersuchenden Zellen erstellt und gespeichert, um die darin enthaltenen Elemente zu erfassen. Die Zink-Bilder wurden für diesen Schritt herangezogen, da sie die Histologie am besten wiedergaben ( Abbildung 2.3.6, Abbildung 2.3.5 )

Nach dem Erstellen der Masken wurden die o.g. Daten nun für die ausgewählten Zellen ermittelt.

Da die Software die Palette der Farben abhängig von minimalem und maximalem Helligkeitswert vergibt, lassen sich zwei Bilder zwar mathematisch, aber nicht visuell vergleichen. Ist zum Beispiel die Elementkonzentration in einem Bild insgesamt deutlich niedriger als im Vergleichsbild, können beide trotzdem sehr ähnlich aussehen.

Um dies für die visuelle Auswertung zu berücksichtigen, wurde die Funktion „Color Balance“ benutzt. Jeweils ein Bild wurde zunächst per „AUTO“-Funktion automatisch hinsichtlich Kontrast und Helligkeit, sowie Maximal- und Minimalwerten optimiert. Die exakt gleichen Einstellungen wurden durch Aktivierung der Option „propagate on all open images“ auch für das jeweils andere Bild angewendet.

Die im Ergebnisteil gezeigten Bilder lassen sich so direkt auch visuell miteinander (je

---

Element) vergleichen.

Als Palette wurde „Green Fire Blue“ gewählt, da diese innerhalb der vorhandenen Konzentrationsbereiche einen guten visuellen Kontrast erzeugt.

### Eisen-Spots

Unerwarteterweise traten beim Element Eisen eng fokussierte, sehr hohe Konzentrationen (Spots) auf. Diese Eisen-Spots wurden gesondert analysiert. Da nicht alle Spots identische Helligkeitswerte aufwiesen, wurde ein Verfahren zur Objektivierung der Identifikation der Spots definiert.

Hierzu wurde die „Threshold“-Funktion benutzt, die alle Pixel unter einem bestimmten Helligkeitswert ausblendet. Der Helligkeitswert (0,5) wurde so gewählt, dass alle sichtbaren Spots, aber kein Hintergrund eingeschlossen war.

#### *2.3.10 Surface-Plots mit ImageJ*

Um die intrazellulären Unterschiede der Elementkonzentrationen und Verteilungen besser visualisieren zu können, bietet ImageJ die Funktion „Surface-Plot“. Hier wird ein dreidimensionales Bild generiert, bei dem jedem Bildpunkt ein Höhen-, bzw. z-Wert, abhängig von seiner Helligkeit zugeordnet wird. Da die Helligkeit hier der Konzentration entspricht, sind im Surface-Plot Punkte mit höherer Elementkonzentration auch tatsächlich höher.

Die Funktion wurde für jedes untersuchte Element mit Hilfe der gespeicherten Auswahlmasken auf Wildtyp- bzw. *Lurcher* PC angewendet.

#### *2.3.11 Datenanalyse mit Excel*

In Excel wurden die mittels ImageJ gewonnenen Daten der beiden Zellen miteinander verglichen. Außerdem wurden die Eisen-Spots in der Wildtyp-Zelle in Relation zum Zellsoma untersucht.

---

### Vergleich zwischen Wildtyp- und Lurcher-PC

Die Konzentrationen ( = Mean-Wert) der Elemente in den beiden Zellen wurden durch Quotientenbildung miteinander verglichen. Da der Datensatz nicht normalverteilt und die Stichprobenzahl außerdem zu klein war ( $n = 1$ ), war eine Auswertung mittels statistischen Methoden ausgeschlossen.

### Untersuchung der Eisen-Spots in der Wildtyp-PC

Zunächst wurden die gemessenen Areale sowie die Massen (=IntegratedDensity) summiert (Funktion: Sum() ). Dann wurde die durchschnittliche Konzentration der Spots ermittelt (Funktion: Average() ). Abschließend wurden diese Werte jeweils mit denen der gesamten Zelle verglichen (Quotienten- bzw. Prozentsatzbildung).

## **3. Ergebnisse**

Die zunächst geplante Fragestellung nach der Rolle der Spurenelemente bei Neurodegeneration wurde nach einiger Zeit erweitert. Da sich in der Timm-Färbung nicht nur ein Unterschied zwischen Wildtyp und *Lurcher* Mutante zeigte, sondern auch eine auffällige Veränderung der Zinkverteilung während der Entwicklung des Kleinhirns, beschlossen wir, auch diesen Aspekt näher zu untersuchen.

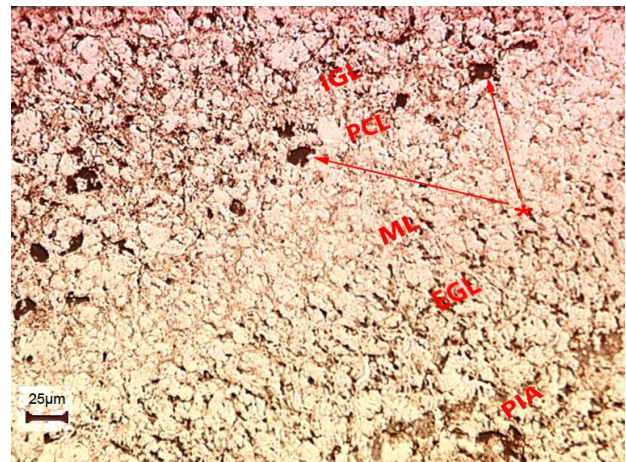
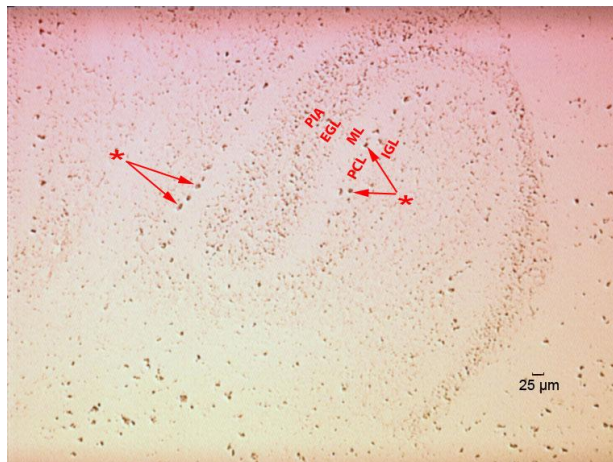
### **3.1 Timm-Färbung**

#### *3.1.1 Postnataler Zeitverlauf von p7-p125 während der normalen Kleinhirnentwicklung des Wildtyps*

P7 ( Abbildung 3.1.1, Abbildung 3.1.2 )

Zum Zeitpunkt p7 zeigte sich im Wildtyp eine insgesamt schwache Färbung. Gefärbt waren vor allem prämitotische Zellen der externen Körnerzellschicht (EGL). Vereinzelt fanden sich Timm-positive Purkinjezellen. Wie auch zu späteren Zeitpunkten

erschien die Färbung der PCs nukleär lokalisiert, mit kleinen, ungefärbten Einschlüssen.



**Abbildung 3.1.1:** Kleinhirn Wildtyp, p7, Scalebar 25μm \* = Purkinjezellen, PIA=Pia Mater, EGL=Externe Körnerzellschicht, ML=Molekularschicht, PCL= Purkinjezellschicht, IGL= Innere Körnerzellschicht

**Abbildung 3.1.2:** Kleinhirn Wildtyp, p7, Scalebar 25μm \* = Purkinjezellen, PIA=Pia Mater, EGL=Externe Körnerzellschicht, ML=Molekularschicht, PCL= Purkinjezellschicht, IGL= Innere Körnerzellschicht

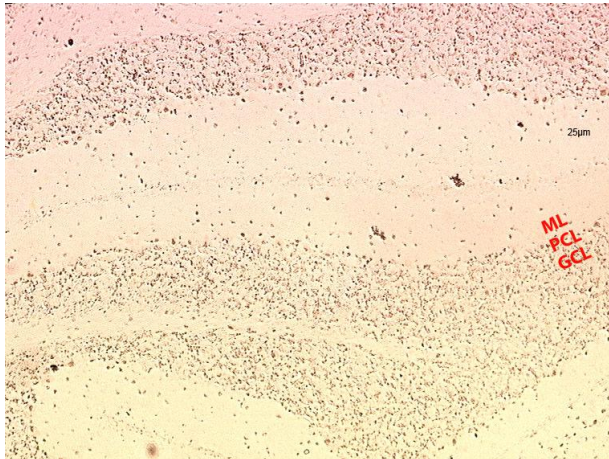
#### P14 (Abbildung 3.1.3, Abbildung 3.1.4)

Im Alter von 14 Tagen ist die Migration der Körnerzellen weitestgehend abgeschlossen. Die Körnerzellschicht (GCL) befindet sich nun komplett zwischen Purkinjezellschicht (PCL) und weißer Substanz.

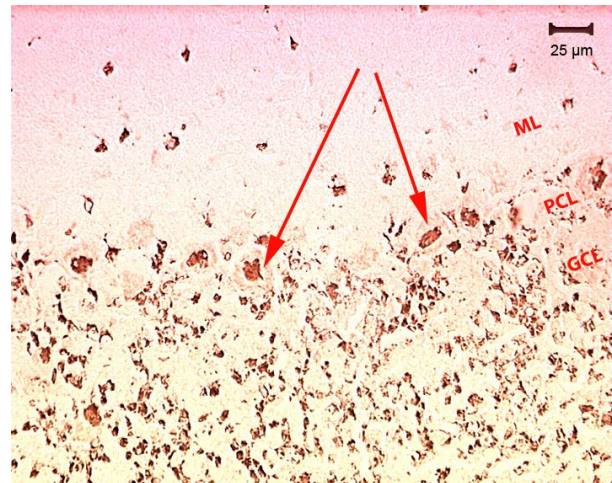
Die Timm-Färbung markierte zu diesem Zeitpunkt die Mehrheit der Zellen der GCL. Weiterhin waren positive Zellen in der Molekularschicht (ML) vorhanden, deren Identität aber bislang nicht geklärt werden konnte. Auch hier war die Färbung überwiegend intrazellulär, vor allem auf die Nuclei beschränkt.

Die Häufigkeit der positiven PCs war hier im Vergleich zu p7 deutlich höher, dennoch waren aber weiterhin zahlreiche ungefärbte PCs vorhanden. Das Cytosol dieser Zellen blieb weiterhin Timm-negativ. Insgesamt zeigte sich bis p14, dass Zink in höheren Konzentrationen vor allem auf die Zellkerne beschränkt ist und nur vereinzelt im Interstitium lokalisiert ist.





**Abbildung 3.1.3: Kleinhirn Wildtyp, p14, Scalebar 25µm, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, GCL: Körnerzellschicht**



**Abbildung 3.1.4: Kleinhirn Wildtyp, p14, Scalebar 25µm, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, GCL: Körnerzellschicht, Pfeile markieren Purkinjezellen**

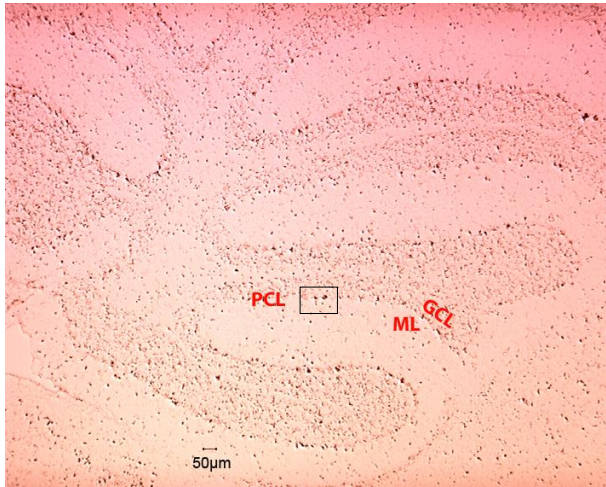
### P19

Zum Zeitpunkt p19 werden keinerlei Unterschiede zu p14 erkennbar.

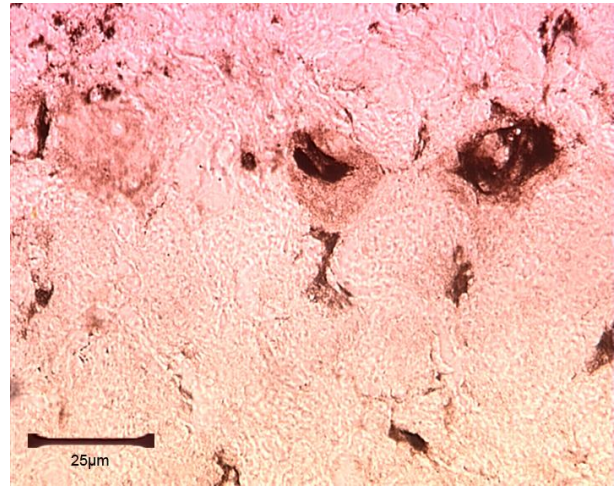
### P22 ( Abbildung 3.1.5, Abbildung 3.1.6 )

Im Alter von 22 Tagen war das Bild insgesamt sehr ähnlich wie in den vorangegangenen Altersstufen, allerdings mit einer wichtigen Ausnahme: Die Zellkörper der PCs hoben sich deutlich vom umgebenden Interstitium ab. Die Zellkerne waren weiterhin am stärksten Timm-gefärbt, das bislang negative PC-Cytosol enthielt zu diesem Zeitpunkt aber offensichtlich ebenfalls mehr Zink als der benachbarte Extrazellulärraum. In der Übersicht ( Abbildung 3.1.5 ) ist die PCL gut erkennbar. In Abbildung 3.1.6 sind drei PCs sichtbar, die jeweils in einer anderen Ebene geschnitten sind. Die zytosolische Anfärbung schien auf das Soma der Zellen beschränkt, der markante Dendritenbaum der PCs wurde nicht sichtbar.





**Abbildung 3.1.5: Übersicht Wildtyp, p22, Scalebar 50µm, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjellschicht, GCL: Körnerzellschicht, Rahmen zeigt den Ausschnitt des rechten Bildes**

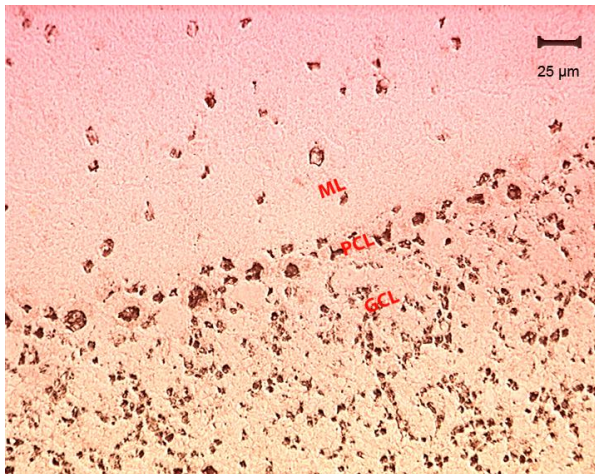


**Abbildung 3.1.6: 3 Purkinjezellen, Wildtyp, p22, Scalebar 25µm**

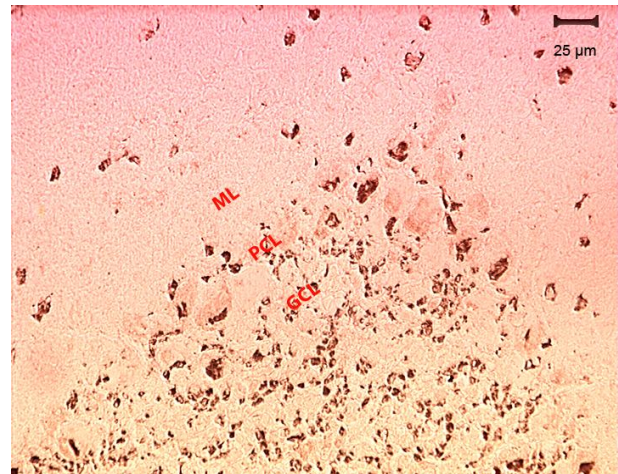
### P24 (Abbildung 3.1.7, Abbildung 3.1.8)

Bei p24 war die bei p22 in allen PCs vorhandene, somatische Färbung weiterhin vorhanden, aber deutlich schwächer. Es zeigten sich regionale Unterschiede innerhalb des Kleinhirns. Während nach wie vor alle Nuklei positiv waren, gab es Areale, die bezüglich der somatischen Färbung nicht vom Zustand bei p22 zu unterscheiden waren. In anderen Kleinhirnregionen war dagegen bereits ein Zustand erreicht, der dem Zeitraum zwischen p14 und p22 entsprach. Diese Unterschiede in der Färbeintensität folgten allerdings keinem erkennbaren Muster.

In der GCL schien bei p24 die Dichte der Timm-positiven Zellen im Vergleich zum Restgewebe leicht reduziert, während die ML gegenüber p22 unverändert gefärbt war.



**Abbildung 3.1.7: PCL, Wildtyp, p24. Kaum somatische Anfärbung, Scalebar 25µm, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, GCL: Körnerzellschicht**



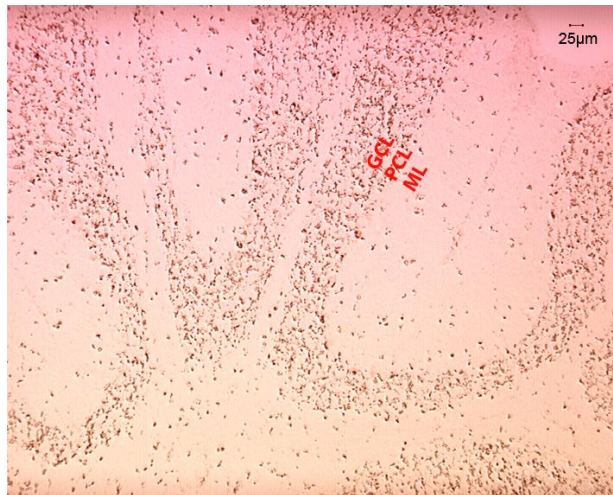
**Abbildung 3.1.8: Gleiches Präparat wie links, deutlich stärker gefärbte PCs, Scalebar 25µm, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, GCL: Körnerzellschicht**

P29 (Abbildung 3.1.9, Abbildung 3.1.10)

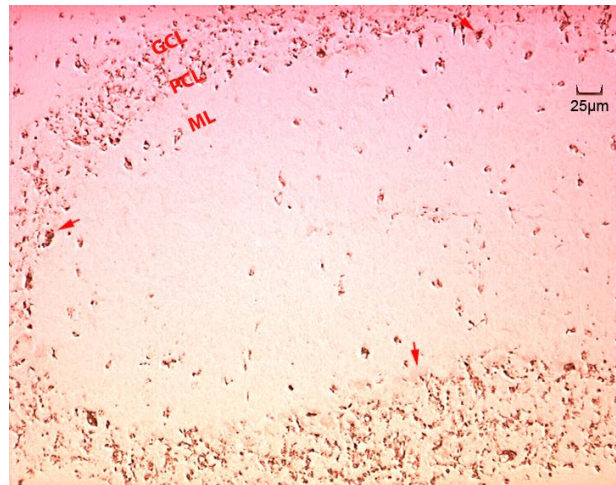
Der bei p22 und p24 beobachtete Trend der somatischen Färbung setzte sich auch bei p29 fort. Nur vereinzelt waren leicht Timm-positive PC-Somata auffindbar, während die Kernfärbung weiterhin bestehen blieb. Abbildung 3.1.10 zeigt drei PCs, die jeweils unterschiedliche somatische Färbintensität aufweisen.

In den anderen Schichten war kein Unterschied zu p24 erkennbar.





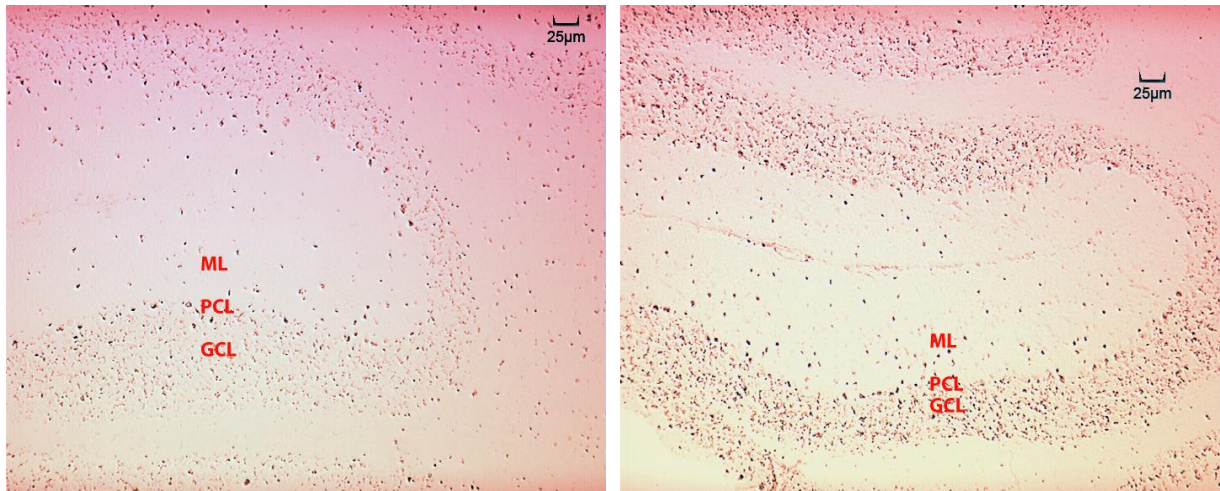
**Abbildung 3.1.9: Übersicht Kleinhirn, Wildtyp, p29, Scalebar 25μm, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjzell-schicht, GCL: Körnerzellschicht**



**Abbildung 3.1.10: Kleinhirn, Wildtyp, p29, Scalebar 25μm, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjzell-schicht, GCL: Körnerzellschicht, Pfeile markieren Purkinjzellen**

P83 und p120 (Abbildung 3.1.11, Abbildung 3.1.12)

Zur Unterscheidung der Zinkverteilung bei adulten Tieren wurden zwei weitere Experimente mit Tieren im Alter von 83 bzw. 120 Tagen durchgeführt. Diese Altersstufen sollten Aufschluss darüber geben, ob auch nach Abschluss der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns noch Veränderungen stattfinden. Abbildung 3.1.11 und Abbildung 3.1.12 zeigen jeweils Kleinhirnübersichten dieser beiden Altersstufen. Der Vergleich zeigt: Zum einen die Variabilität der Timm-Färbeintensität bei identischem Protokoll. Zum anderen wird deutlich, dass trotz der Intensitätsunterschiede die Verteilung sehr ähnlich ist. Beide Präparate zeigen eine hohe Dichte gefärbter Körnerzellen in der GCL, die jedoch eine geringere Dichte positiver Zellen aufwies als in den jüngeren Altersstufen. Neben einer moderaten Anzahl Timm-positiver PC-Nuklei waren außerdem vereinzelt Timm-positive Zellen in der ML vorhanden. Während also die Intensität und Anzahl der jeweils gefärbten Strukturen in den adulten Tieren niedriger schien, war das generelle Verteilungsmuster identisch zu den ersten postnatalen Wochen.



**Abbildung 3.1.11: Übersicht Kleinhirn, Wildtyp, p83, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, GCL: Körnerzellschicht, Scalebar 25µm** **Abbildung 3.1.12: Übersicht Kleinhirn, Wildtyp, p120, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, GCL: Körnerzellschicht, Scalebar 25µm**

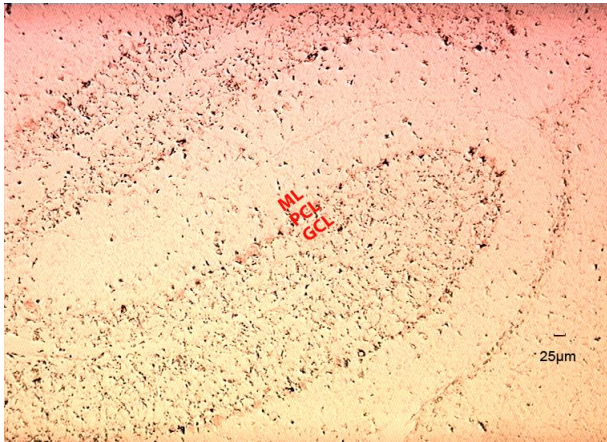
### 3.1.2 Vergleich: Wildtyp und Lurcher-Mutante

Bei p7 war kein histologischer Unterschied zwischen *Lurcher*-Mutante und gleichaltrigen Wildtypen festzustellen. Gleiches galt für die Zinkfärbung. Sowohl in Übersichtsaufnahmen als auch in bis zu 100facher Vergrößerung ließen sich keine Abweichungen feststellen.

Bei p14 besteht durch die Degeneration von PCs und GCs in *Lc/+* bereits einen deutlichen Größenunterschied zwischen dem *Lurcher*-Kleinhirn und dem Wildtyp-Korrelat. Doch auch zu diesem Zeitpunkt waren im Hinblick auf die Zinkverteilung keine Unterschiede feststellbar.

Erst ab p22 ließ sich das *Lc/+* Kleinhirn mit Hilfe der Zn-Färbung vom Wildtyp Cerebellum unterscheiden. Die für p22 charakteristische, deutliche Anfärbung der Somata der PCs fehlte in der *Lurcher*-Mutante vollständig (vgl. Abbildung 3.1.13 und Abbildung 3.1.14 ) und war auch zu keinem späteren Zeitpunkt mehr erkennbar. Von p22 bis p83 nahm die Anzahl der Timm-positiven Zellen in PCL/GCL durch die fortschreitende Degeneration in *Lc/+* weiter kontinuierlich ab.



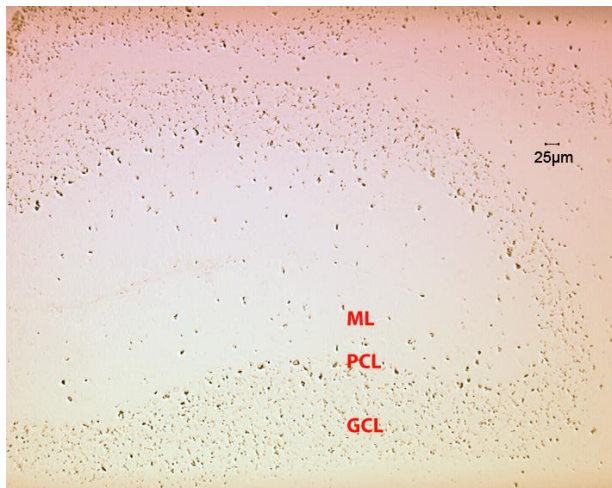


**Abbildung 3.1.13: Kleinhirn, Wildtyp, p22, Scalebar 25µm, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezell-schicht, GCL: Körnerzellschicht**

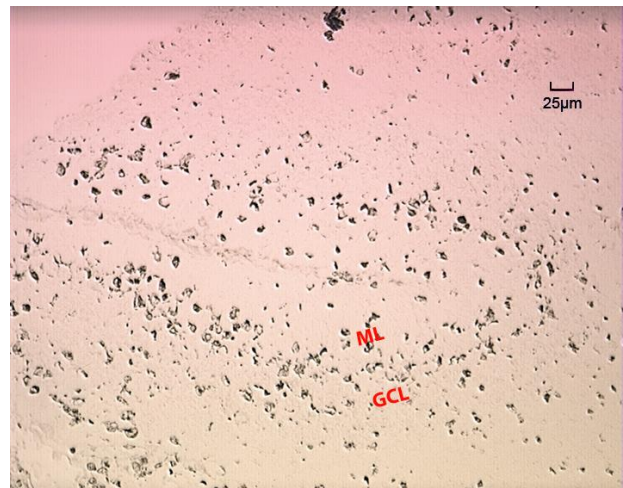


**Abbildung 3.1.14: Kleinhirn, Lurcher, p22, Scalebar 25µm, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezell-schicht, GCL: Körnerzellschicht**

Im adulten (p83) *Lc/+* Kleinhirn ( Abbildung 3.1.16 ), in dem PCs völlig abwesend und GCs zu 90% reduziert sind, waren dennoch viele Timm-positive Zellen erkennbar. Diese Zellen waren etwas kleiner als PCs, lagen aber überwiegend in und um die „ehemalige“ PCL. Gefärbte Zellen in ML und GCL waren eher vereinzelt und in geringerer Dichte als im Wildtyp ( Abbildung 3.1.15 ) vorhanden.



**Abbildung 3.1.15: Kleinhirn, Wildtyp, p83, Scalebar 25µm, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezell-schicht, GCL: Körnerzellschicht**



**Abbildung 3.1.16: Kleinhirn, Lurcher, p83, Scalebar 25µm, ML: Molekularschicht, GCL: Körnerzellschicht**

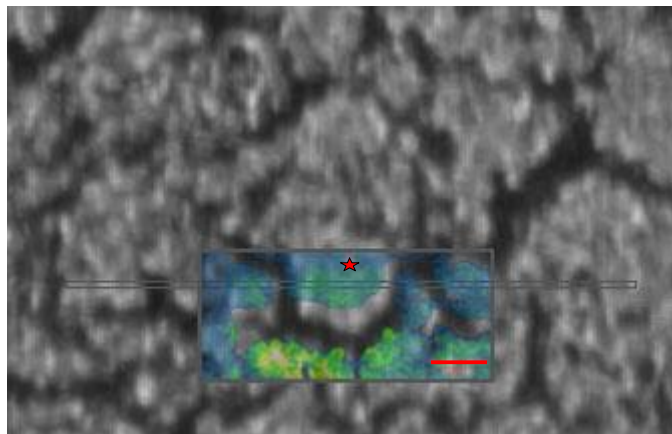
---

## 3.2 Synchrotron-Messungen

Die im Synchrotron gewonnenen Daten gaben erstmals einen Einblick in die Verteilung der Spurenelemente in der Purkinjezelle. Insbesondere auf die in der Einleitung beschriebenen Metalle Zink, Kupfer, Mangan und Eisen soll hier näher eingegangen werden.

### 3.2.1 Allgemeine Beobachtungen

Histologisch fielen zunächst größere, schwarze Areale auf, die sich in der lichtmikroskopischen Darstellung vorher so nicht darstellten. Dies wurde auf Erwärmungseffekte der Trägerfolie durch die starke Röntgenstrahlung zurückgeführt. Im Vergleich der lichtmikroskopischen Darstellungen der ausgewählten Purkinjezellen mit den Synchrotronbildern zeigte sich, dass diese durch Verziehungen der Folie geringfügig verkleinert worden waren ( Abbildung 3.2.1 ).



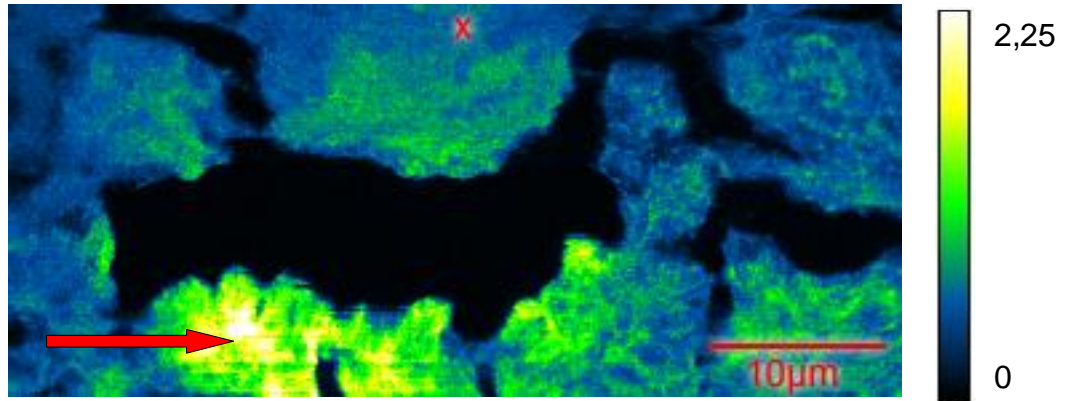
**Abbildung 3.2.1: Wildtyp, Overlay aus Aufnahme des Long-Distance-Mikroskops und der 2D-Zinkverteilung. \* = Purkinjezelle, Scalebar 10µm**

Darüberhinaus war im unteren, linken Bereich der Elementverteilungen im Wildtyp ein stärkeres Signal in allen Einzelauswertungen erkennbar (vgl. Abbildung 3.2.2 ), was durch eine etwas höhere Gewebedicke als Folge der bereits erwähnten Folienverziehungen in diesem Bereich verursacht worden sein könnte. Gleiches galt für die Elementverteilungen im *Lc/+*- Schnitt im rechten, unteren Bildausschnitt (vgl. Abbildung 3.2.3 ), wobei es sich hier zusätzlich um eine Faltung des Gewebes zu

---

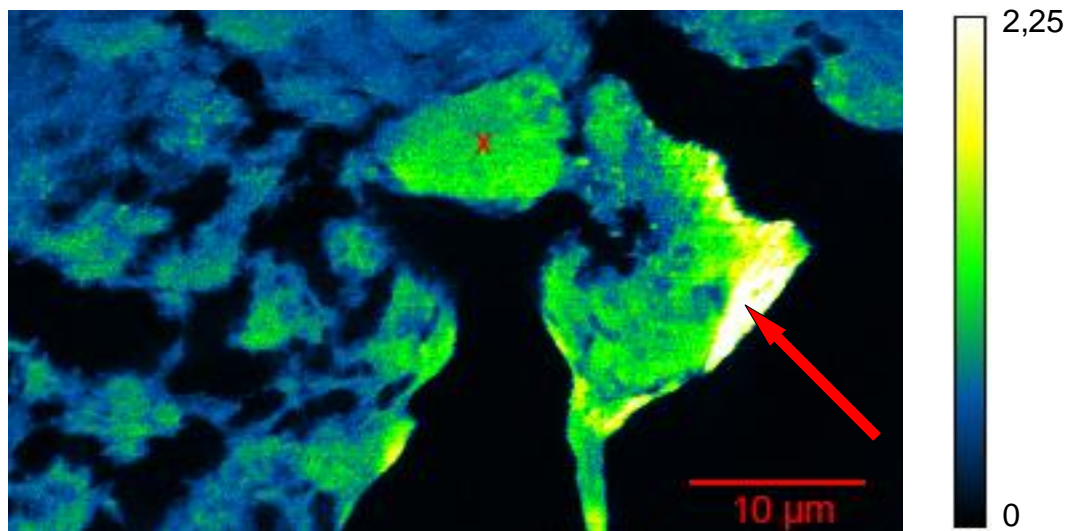
handeln schien. In beiden Fällen waren die zu Purkinjezellen des Interesses von den Gewebeverdickungen nicht betroffen.

### 3.2.2 2D Topographie der Zn Verteilung



**Abbildung 3.2.2: Zn-Verteilung im Wildtyp. X= Purkinjezelle, Pfeil zeigt Gewebeverdickungen. Skala: Relative Konzentration**

Die Analyse der Zinkverteilung ergab eine höhere Konzentration in der *Lurcher-PC* (Abbildung 3.2.2), die entsprechend der mathematischen Auswertung einem Faktor von 1,42 gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 3.2.3) gleichkam. Die intrazelluläre Verteilung war relativ homogen in beiden Zellen.



**Abbildung 3.2.3: Zn-Verteilung in Lc/+. X= Purkinjezelle, Pfeil zeigt Gewebefaltung. Skala: Relative Konzentration**

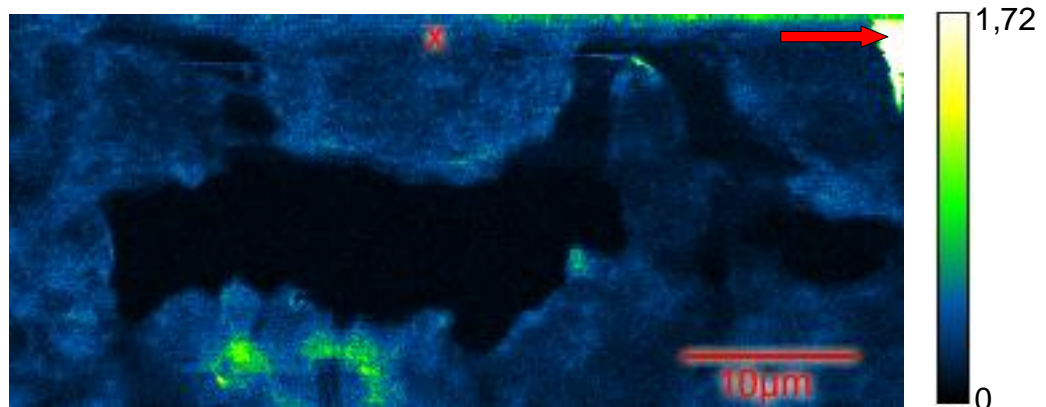
### 3.2.3 2D Topographie der Cu Verteilung

Auch für das Element Kupfer ergab sich ein um den Faktor 2,47 höherer Kupfergehalt in

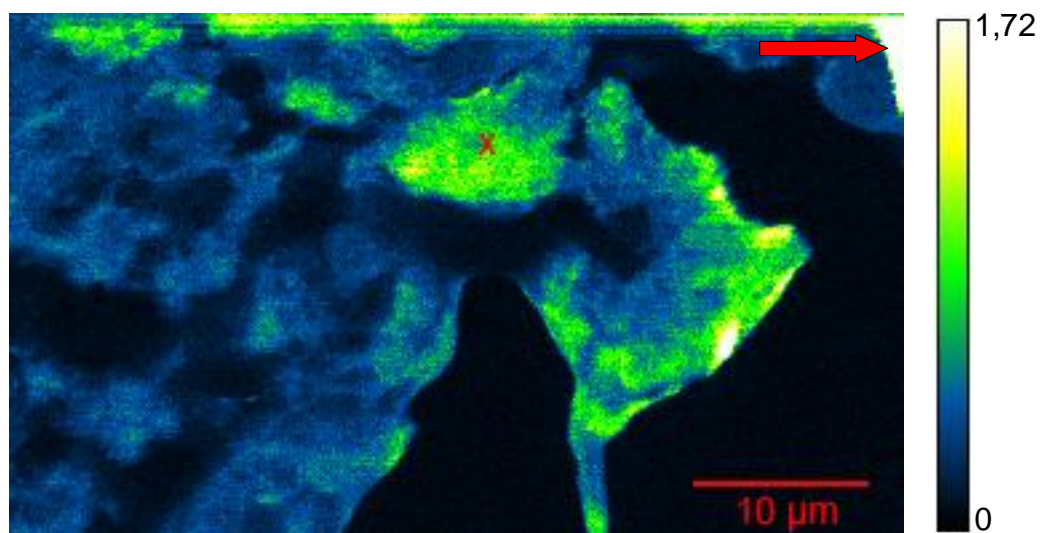


---

der *Lc/+* PC (Abbildung 3.2.5) relativ zur Wildtyp-PC (Abbildung 3.2.4), der sowohl bei visueller Betrachtung als auch durch die Berechnungen deutlich erkennbar war. Die intrazelluläre Verteilung des Kupfers war dabei der Zn-Verteilung sehr ähnlich, ohne deutlich abgrenzbare, regionale Kompartimentierungen. Auffallend an den Kupfermessungen war ein Artefakt in den oberen Horizontalzeilen und besonders in der rechten, oberen Ecke der Scans. Die hohen Konzentrationen in diesen Arealen waren in keiner der anderen Elementdarstellungen, aber sowohl im Wildtyp als auch im Lurcher-Schnitt am selben Ort vorhanden. Diese offensichtliche Fehl-Lokalisation wurde daher auf Interferenzen innerhalb des Messaufbaus zurückgeführt.



**Abbildung 3.2.4: Cu-Verteilung im Wildtyp. X= Purkinjezelle. Pfeil zeigt Kupfer-Artefakt. Skala: Relative Konzentration**

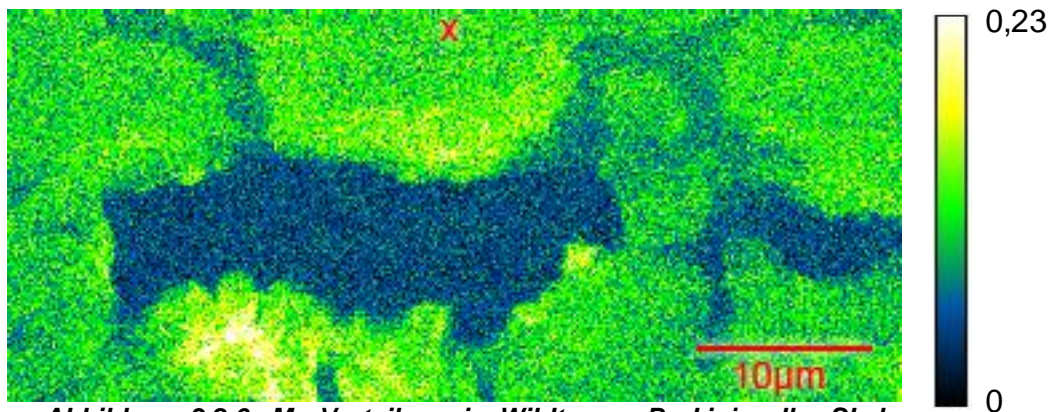


**Abbildung 3.2.5: Cu-Verteilung in *Lc/+*. x=Purkinjezelle. Pfeil zeigt Kupferartefakt. Skala: Relative Konzentration**

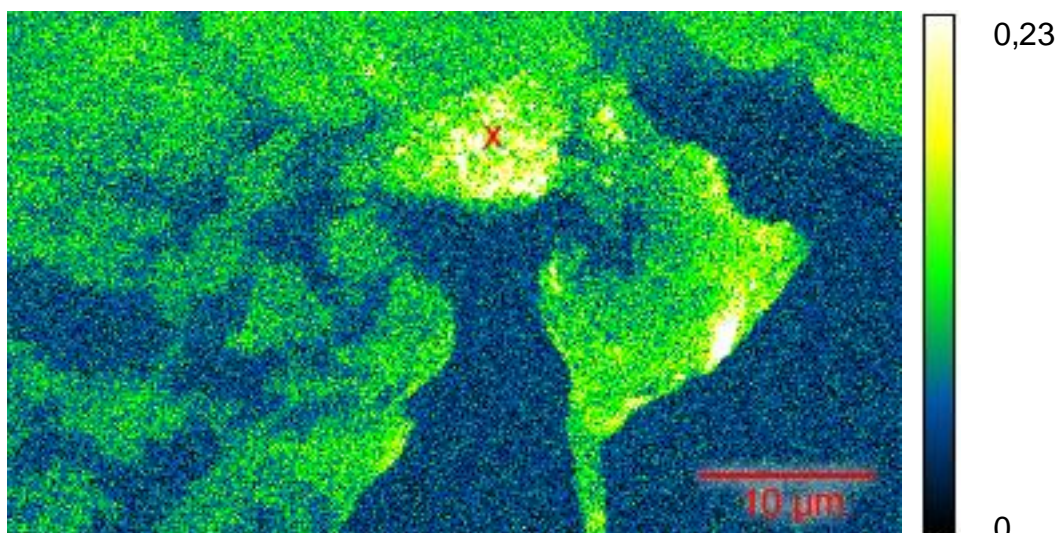


### 3.2.4 2D Topographie der Mn Verteilung

Obwohl auch die quantitative Manganlokalisierung bei visueller Betrachtung zu einer deutlich helleren Purkinjezelle führte, ergab sich bei mathematischer Betrachtung lediglich eine Erhöhung der durchschnittlichen Helligkeitswerte um den Faktor 1,27. Bei eingehender Untersuchung ergaben Maximalwerte in der Lc/+ PC (Abbildung 3.2.7), die bis zu zehnmal höher lagen als in der Wildtyp PC (Abbildung 3.2.6). Im Gegensatz zu dem Elementen Zn und Cu war das Mangan nicht homogen verteilt, sondern in zahlreichen „Spots“ konzentriert, die über die gesamte Zelle verteilt waren. Eine weitere Besonderheit an der Manganverteilung in *Lurcher* war, dass sich hier die Purkinjezelle



**Abbildung 3.2.6: Mn-Verteilung in Wildtyp. x= Purkinjezelle, Skala zeigt relative Konzentration**



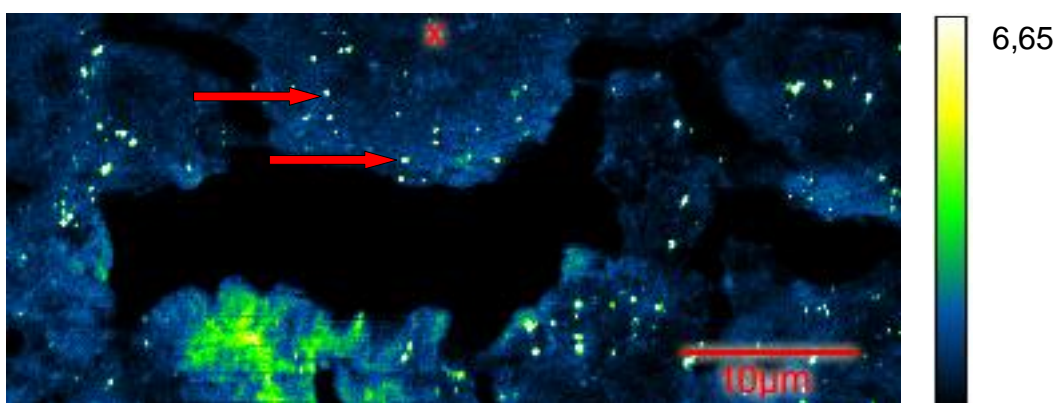
**Abbildung 3.2.7: Mn-Verteilung in Lc/+. x= Purkinjezelle, Skala zeigt relative Konzentration**

besonders deutlich vom restlichen, gescannten Gewebe abhob, während die Wildtyp-PC, ebenso wie bei Zink und Kupfer, eine recht homogene Elementverteilung aufwies.

---

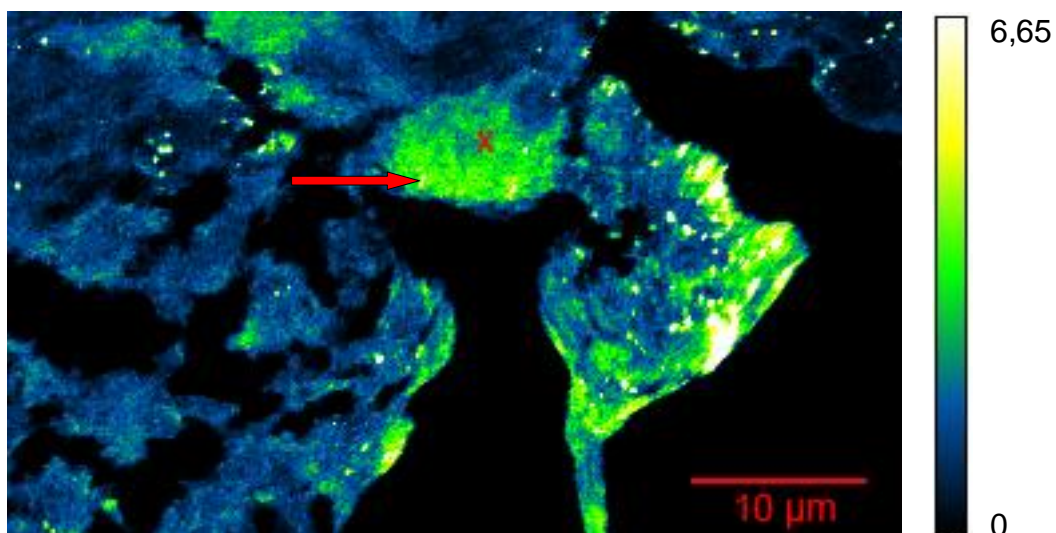
Die relativ inhomogene, „körnige“ Darstellung des gewebefreien Hintergrundes, der in den anderen Verteilungen homogen schwarz erscheint, ist auf die deutlich niedrigeren Mn-Konzentrationen zurückzuführen. Dies erzeugt ein ungünstigeres Signal/Rauschverhältnis und zeigt, dass sich das Mangansignal bei der gewählten Messzeit und Strahlenintensität dicht an der Nachweisgrenze befindet.

### 3.2.5 2D Topographie der Fe Verteilung



**Abbildung 3.2.8: Fe-Verteilung in Wildtyp.  $x$ =Purkinjzelle, Eisenspots (Pfeile), Skala zeigt relative Konzentration**

Auch bei den Eisenverteilungen war die höhere Eisenkonzentration in der *Lurcher*-PC bereits visuell deutlich erkennbar. Dieser Eindruck wurde durch die Analyse der Daten



**Abbildung 3.2.9: Fe-Verteilung in Lurcher.  $x$ =Purkinjzelle. Eisenspots (Pfeile), Skala zeigt relative Konzentration**

(2,69 $\times$ ,) bestärkt. Besonders interessant war hier, dass die Wildtyp-Zelle (Abbildung 3.2.8), bei vergleichsweise niedriger Eisenkonzentration, diskrete „Hotspots“ aufwies.

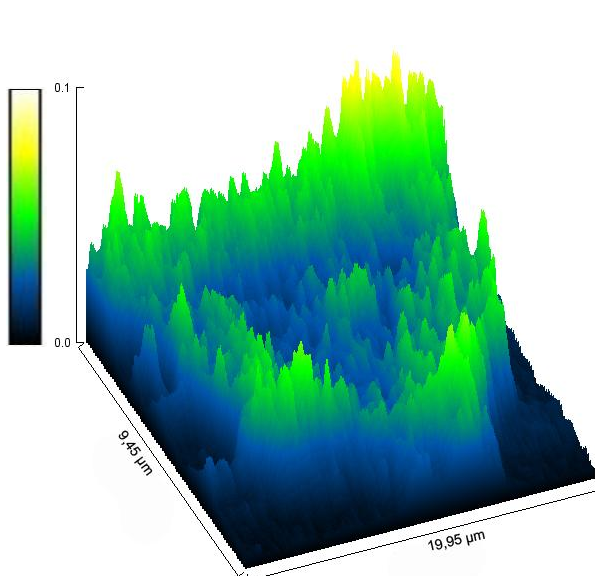
---

Die genauere Untersuchung dieser Spots ergab, dass diese lediglich 0,6% der Fläche der Zelle einnahmen, aber über 5 % des gesamten Eisens enthielten.

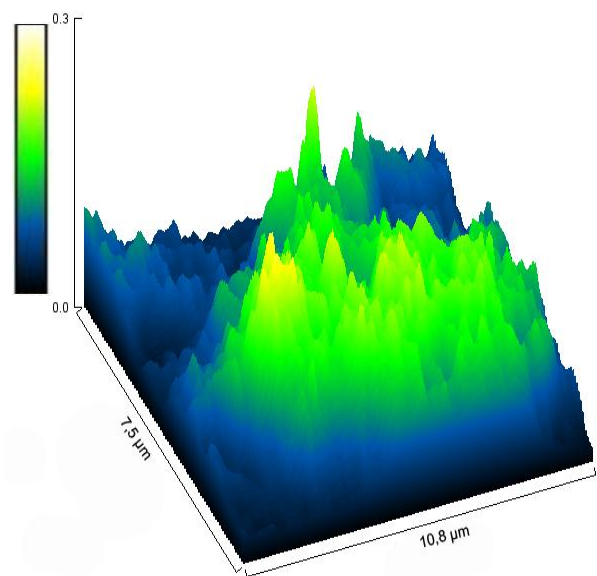
In der *Lurcher*-PC (Abbildung 3.2.9) war die Anzahl der Spots auf vier reduziert und das homogen verteilte Fe bedeutend höher konzentriert, während das umliegende Gewebe eine dem Wildtyp vergleichbare Fe-Konzentration und Dichte an Spots zeigte. Die sterbende PC in *Lc/+* zeigt demnach neben einem generellen Konzentrationsanstieg zusätzlich eine intrazelluläre Umverteilung des Eisens.

### 3.2.6 Surface-Plots der Zn, Cu, Mn und Fe Verteilungen

Im Surface-Plot für Kupfer (Abbildung 3.2.11) hob sich, wie erwartet, der Artefakt mit



**Abbildung 3.2.11: Surface-Plot, Wildtyp-PC, Cu. Ordinate: Relative Konzentration**



**Abbildung 3.2.10: Surface-Plot, Lc/+ - PC, Cu. Ordinate: Relative Konzentration**

höherer Intensität, der schon in der 2D-Darstellung am oberen Bildrand aufgefallen war, deutlich ab. Darüberhinaus wurden durch diese Darstellung höhere Kupferkonzentrationen am Rand der Zelle sichtbar. Dieses Verteilungsmuster innerhalb der PC folgt näherungsweise einer nukleär/cytosolischen Verteilung.

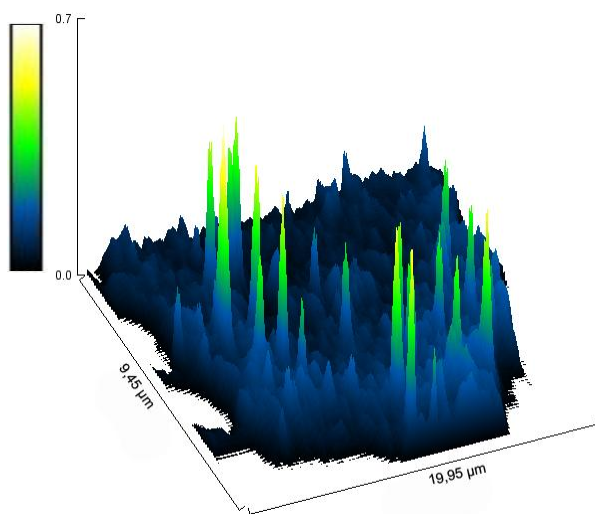
Im Surface-Plot der *Lurcher*-PC (Abbildung 3.2.10) war eine höhere zytosolische Konzentration, wie sie im Wildtyp vorhanden war, nicht erkennbar.



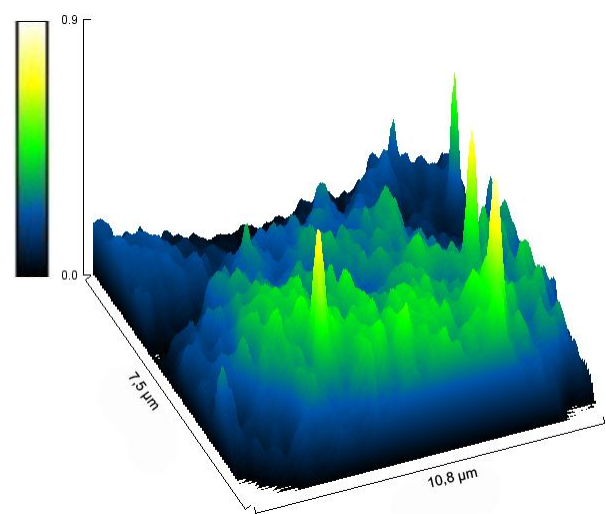
---

Der Plot für Eisen (Abbildung 3.2.12) exponiert die hochkonzentrierten Spots im Wildtyp, die sich deutlich vom Rest der Zelle abhoben. Auch hier ist, wenn auch weniger deutlich, ein ungleiches Verteilungsverhältnis zugunsten des Randbereiches zu erkennen.

Die in der 2D-Darstellung schlechter abgrenzbaren Eisen-Hotspots waren in der Plot-Darstellung (Abbildung 3.2.13) deutlich sichtbar, obgleich der Unterschied zum Rest der Zelle durch die insgesamt gestiegenen Konzentrationen bei Weitem nicht so imponierte wie im Wildtyp.



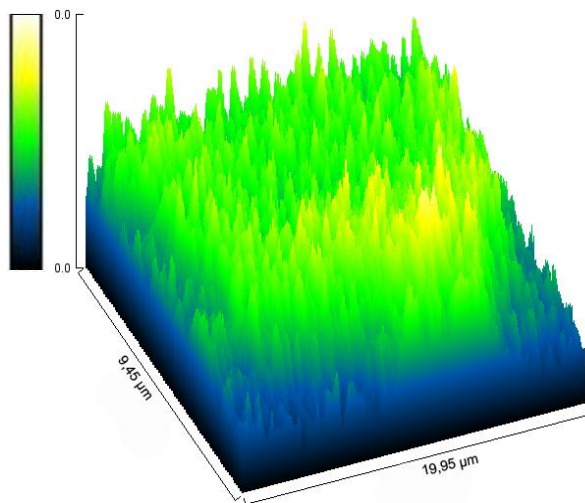
**Abbildung 3.2.12: Surface-Plot, Wildtyp-PC, Fe. Ordinate: Relative Konzentration**



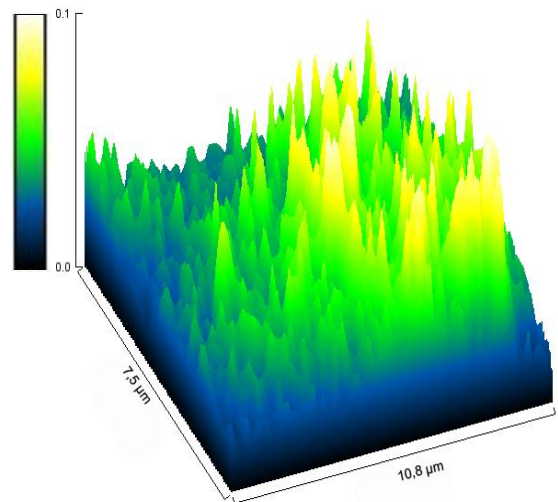
**Abbildung 3.2.13: Surface-Plot, Lc/+ - PC, Fe. Ordinate: Relative Konzentration**

Im Mangan-Plot zeichnet sich ein recht homogenes Bild ab, mit leicht erhöhter Konzentration am unteren Pol der Wildtyp-Zelle (Abbildung 3.2.15).

In der Lc/+ - PC (Abbildung 3.2.14) wurden deutlich über das Grundniveau der Zelle erhabene Spots erkennbar, die im Wildtyp abwesend waren. Eine Beurteilung fiel aufgrund des geringen Signal-/Rauschabstandes schwer, dennoch erschien die Mangan-Verteilung hier eher nukleär.

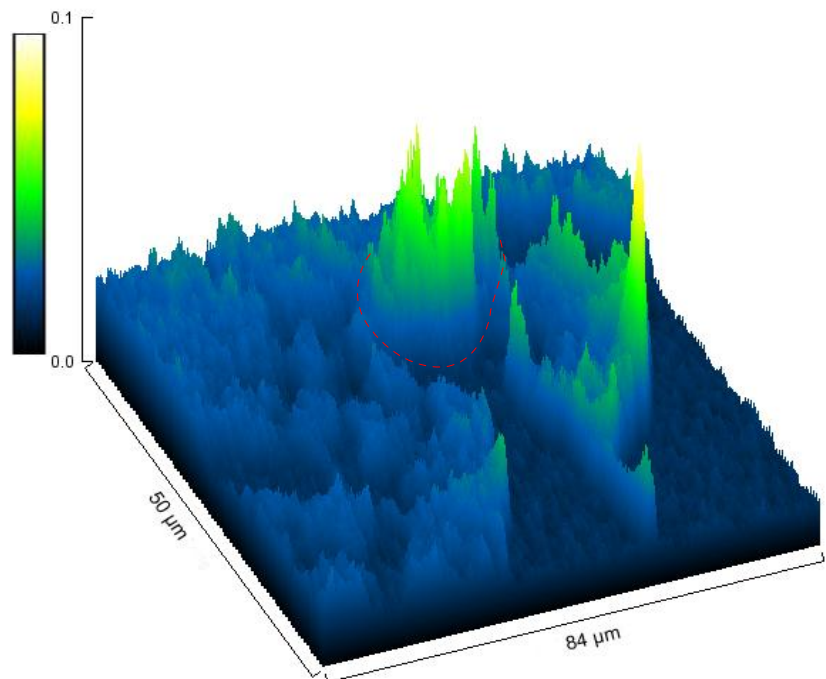


**Abbildung 3.2.15: Surface-Plot, Wildtyp-PC, Mn. Ordinate: Relative Konzentration**



**Abbildung 3.2.14: Surface-Plot, Lc/+ - PC, Mn. Ordinate: Relative Konzentration**

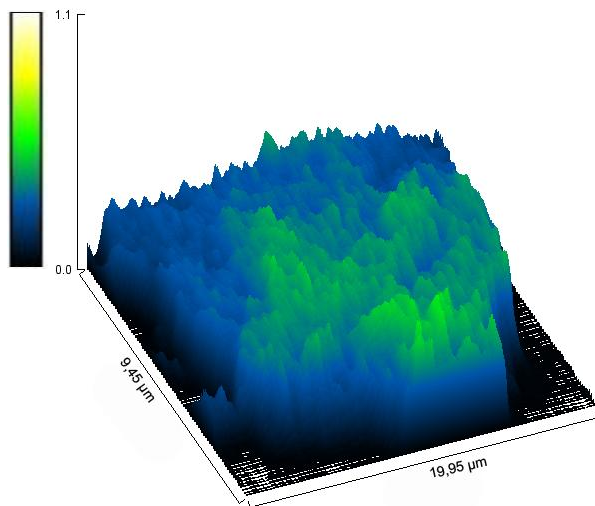
Um die deutliche Abhebung der Purkinjezelle vom restlichen Gewebe besser zu dokumentieren, wurde ein weiterer Surface-Plot für Mn über das gesamte gescannte Bild angefertigt (Abbildung 3.2.16). Neben den erwarteten, durch Faltung verursachten höheren Konzentrationen im Gewebe rechts unten wurde dadurch sehr deutlich, wie Mangan hier die sterbende Zelle geradezu „markierte“.



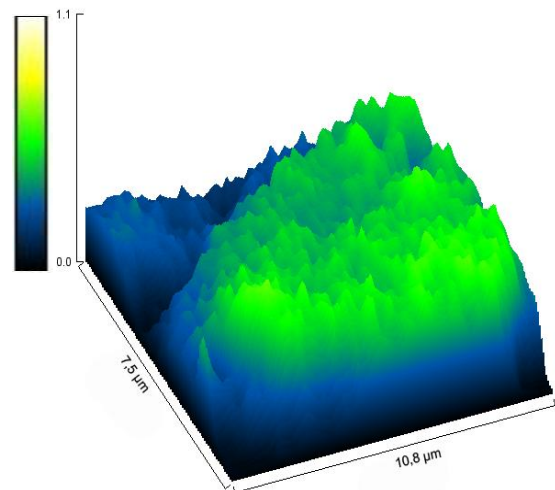
**Abbildung 3.2.16: Surface-Plot, Gesamter Scan, Lc/+ - PC. Ordinate: Relative Konzentration, Gestrichelte Linie = Purkinjezelle**

---

Die Zink-Verteilung der Wildtyp-PC (Abbildung 3.2.17) stellt sich im Surface-Plot weniger homogen dar als im 2D-Bild, allerdings folgten die Inhomogenitäten keinem erkennbaren Muster. Die Lc/+PC (Abbildung 3.2.18) zeigte hinsichtlich der intrazellulären Verteilung keine Auffälligkeiten, weder im Vergleich zum Wildtyp, noch im Vergleich zur 2D-Darstellung.



**Abbildung 3.2.17: Surface-Plot, Wildtyp-PC, Zn. Ordinate: Relative Konzentration**



**Abbildung 3.2.18: Surface-Plot, Lc/+ - PC, Zn. Ordinate: Relative Konzentration**

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodenkritik

#### 4.1.1 Timm-Methode

Zur Darstellung von Zink in Hirngewebe erschien die Timm-Methode, vor allem mangels verlässlicher Alternativen als Methode der Wahl. Die gewonnenen Ergebnisse müssen dennoch aus folgenden Gründen unter Vorbehalt betrachtet werden:

#### Qualität

Bis heute konnte nicht zweifelsfrei bewiesen werden, welche Form des physiologisch vorkommenden Zinks mit der Timm-Methode nachgewiesen wird. Sicher scheint, dass vesikuläres Zink erfasst wird, außerdem sog. "loosely bound Zinc" wobei letzteres nicht näher spezifiziert wird(64).

---

### Quantität

Die schwer zu beherrschende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die enorme Abhängigkeit vom Reinheitsgrad der verwendeten Substanzen (v.a. Gummi Arabicum) erlauben keine verlässliche Quantifizierung.

Trotz der vorgenannten Einschränkungen kann die Timm-Methode nützliche Erkenntnisse liefern - zum einen im Hinblick auf intraindividuelle Unterschiede und histologische Verteilungsmuster des Zinks, zum anderen aber auch bezüglich zeitabhängiger Änderungen im Verteilungsmuster.

#### 4.1.2 SXRFS

Das Synchrotron verbindet höchste Sensitivität und Spezifität mit hoher Auflösung. Keine andere Methode ist in der Lage, nanomolare Elementkonzentrationen sicher nachzuweisen, zu identifizieren und gleichzeitig die zweidimensionale Verteilung dieser Elemente darzustellen. Im Hinblick auf die Frage nach der intrazellulären Verteilung von Spurenelementen wie Kupfer, Eisen und Mangan existiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Alternative zum Synchrotron.

### Limitationen

Diese sehr aufwendige Methode limitiert andererseits den Umfang der Messungen. So ist für die Einwerbung von Messzeit ein umfangreicher Antrag mit peer review Verfahren erforderlich, sowie der Nachweis von erfolgversprechenden Vorversuchen, die ihrerseits idealerweise ebenfalls an einem (anderen) Synchrotron durchgeführt wurden.

Die Planung und Vorbereitung der Experimente kann erst begonnen werden, wenn die Zusage für Messzeit vorliegt.

Die eingeworbene Messzeit, die in der Regel nur wenige Tage umfasst, reicht bei einer Auflösung im nm-Bereich zur Messung zweier Zellen sowie Teilen der jeweiligen Nachbarzellen. Durch diese minimale Fallzahl stellt sich die Frage, inwieweit die gewonnenen Ergebnisse verallgemeinert werden können bzw. welche Aussagen sich von der Messung zweier „single cases“ ableiten lassen.

---

Dennoch handelt es sich bei den in dieser Arbeit vorgelegten Daten um die erstmalige Darstellung der subzellulären Verteilung der wichtigsten Spurenelemente in „gesunden“ und sterbenden Purkinjezellen. Nach unserem Kenntnis existiert derzeit keine vergleichbare Arbeit mit dieser Auflösung in Hirngewebschnitten.

Die hier dargestellte Methode in dieser Auflösung befindet sich im Entwicklungsstadium und birgt daher großes Verbesserungspotential z.B. im Hinblick auf Geschwindigkeit (kürzere Messzeit pro Pixel durch Verwendung zweier Detektoren) und weitere Automatisierung der Auswertung. Neue Fragestellungen, wie z.B. nach der subzellulären Lokalisation von zwei- und dreiwertigem Eisen, können nun angegangen werden. Die Arbeit steht daher auch im Kontext der Weiterentwicklung dieser Technik und hat wertvolle Erkenntnisse zur Verbesserung und weiteren Erhöhung der Auflösung geliefert, die hier nicht dargestellt sind.

## **4.2 Diskussion der Timm-Ergebnisse**

### *4.2.1 Zink während der „regulären“ Kleinhirnentwicklung*

Die Veränderungen der cerebellären Zinkverteilung während der ersten 30 postnatalen Tage im Wildtyp war ein überraschendes Ergebnis. Vorangegangene Experimente (Neutronen-Aktivationsanalyse, NAA) unserer Arbeitsgruppe ließen eine allgemeine Abnahme der Zinkkonzentration erwarten(5), konnten aber bedingt durch die fehlenden Ortsinformationen der NAA die hier gewonnenen Ergebnisse vorhersagen.

Insbesondere die PCs zeigten ein unerwartetes, zeitlich differenziertes Muster. Die zunächst überwiegend nukleäre Zinklokalisierung, die überdies nicht alle Zellen gleichermaßen betraf, wurde an bzw. um p22 durch eine cytosolische Komponente ergänzt.

Sowohl die Migration als auch die Synaptogenese der PCs sind zu diesem Zeitpunkt in der Maus weitestgehend abgeschlossen(67). Der kurze, cytosolische Anstieg der



---

Zinkfärbung markiert dadurch gewissermaßen den Endpunkt dieser entwicklungsbiologischen Prozesse.

Möglicherweise agitiert Zink hier als Teil einer Signalkaskade, die den Übergang in diesen Entwicklungsstatus der Purkinjezelle reguliert(68). Es ist bekannt, dass Zinkfingerproteine als Transkriptionsfaktoren eine besondere Rolle bei der neuronalen Entwicklung spielen(69). Ein verstärkter Abbau Zn-abhängiger Faktoren könnte einen cytosolischen Anstieg des Zinks hervorrufen, der, durch die NAA-Ergebnisse ermittelt, nicht zu einer Zunahme der Gesamtkonzentration führen würde. Diese Annahme würde erklären, weshalb die Konzentration bis etwa p35 abnimmt. Der transiente Charakter des cytosolischen Anstiegs der [Zn] könnte durch die Beseitigung des Zn nach Abbau der Zn-abhängigen Faktoren bedingt sein, da freies Zink toxisch für die Zelle ist. Die kurze Dauer der cytosolischen Zinkakkumulation wäre dadurch erklärbar. Zur Untermauerung dieser These sind weitere Untersuchungen im Hinblick auf die neuronalen Zinktransporter bzw. deren Expression im genannten Zeitraum nötig.

Neben PCs lässt die postnatale Dynamik der Zn-Verteilung auch die anderen Timm-positiven Zellen des Kleinhirns eine entwicklungsbiologische Rolle des Zinks vermuten. Im Einklang mit den NAA-Daten nahm die Dichte positiver Körnerzellen in der GCL mit zunehmendem Alter ab. Eine Rolle des Zinks während der Migration und Synaptogenese der Gcs ist daher naheliegend.

Eine aktive Rolle des Zn im Sterbeprozess ließe daher erwarten, dass jeweils einige PCs und/oder Gcs bei jeder Altersstufe durch ein vom Wildtyp und von nicht degenerierenden Neuronen in *Lc/+* differierendes Verteilungsmuster oder durch veränderte Färbeintensitäten „erkennbar“ wären.

Dieses Annahme wurde darüberhinaus gestützt durch die NAA-Massenanalyse, die einen deutlichen cerebellären Anstieg der [Zn] in *Lc/+* während des Degenerationszeitraums erkennen ließ.

#### 4.2.2 Zink im Kleinhirn der *Lurcher*-Mutante

Durch die vollständige Degeneration der PC-Population und die massive GC-

---

Degeneration während des Untersuchungszeitraums in *Lc/+* ist zu erwarten, dass sich, insbesondere bei den mittleren Altersstufen um p20, eine Fraktion von PCs und Gcs im Degenerationsprozess befindet.

Entgegen dieser Annahme waren aber durch die Timm-Färbung weder PCs noch GCs mit deutlich abweichenden Färbecharakteristika erkennbar. Die später durch SXRFs detektierte Erhöhung von [Zn] um etwa das 1,4fache war mit Timm nicht darstellbar. Vielmehr nahm die Anzahl Timm-positiver PCs und GCs, entsprechend der degenerationsbedingten Abnahme dieser Zellen, ab.

Die wenigen verbliebenen, Timm-positiven Zellen in der GCL sind möglicherweise Mikroglia-Zellen, die zuvor durch die höhere GC-Dichte nicht sichtbar wurden.

Eine Zunahme der [Zn] im *Lc/+* Cerebellum kann demzufolge nur durch Akkumulation in den anderen Neuronen oder in extraneuronalem Gewebe (z.B. Glia) bzw. im Extrazellularraum erklärt werden. In Betracht kommt auch, dass im Zuge des Degenerationsprozesses eine starke Verlagerung der Zustandsform des Zinks vom gebundenen in den ungebundenen Zustand erfolgt und diese Form nicht durch die Timm-Methode, aber durch NAA und SXRFs nachweisbar ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Timm-Methode Anhaltspunkte für eine funktionelle Rolle des Zn während der normalen postnatalen Entwicklung des Kleinhirns liefert. Im Gegensatz dazu zeigt die Methode keine Indizien für eine Beteiligung des Zn am Degenerationsprozess der PCs und GCs im *Lc/+* Kleinhirn, wobei unklar bleibt, ob technikhärente Limitationen oder reale Zn-Verteilungen ursächlich sind. Der Nachweis einer Konzentrationszunahme während des Degenerationsverlaufs mit anderen, höchst validen Methoden lässt Ersteres vermuten.

---

## 4.3 Diskussion der Synchrotron-Ergebnisse

### 4.3.1 Eisen

Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Neuronen des ZNS enthalten PCs kein normales, mit konventionellen Antikörpern markierbares Ferritin(28). Im Gegenzug wird in PCs eine spezielle, mitochondriale Form des Ferritins (*MtFt*) synthetisiert, die insbesondere in den PCs stark exprimiert wird(30).

Die Fe-Lokalisation der Wildtyp-PC ergab, abgesehen von hochkonzentrierten Spots, ein niedriges, generelles Eisenniveau, dessen Konzentration mit der in umliegenden Zellen vergleichbar war. Obwohl die Abwesenheit von cytosolischem Ferritin und freiem Eisen in Purkinjellen nahelegt, dass es sich bei den Spots um (cytochromhaltige) Mitochondrien handelt, spricht deren geringe Anzahl dagegen. Insbesondere metabolisch hochaktive Zellen wie PCs enthalten deutlich mehr der ATP-Lieferanten. Santambrogio(30) konnte außerdem zeigen, dass *MtFt* ubiquitär im Cytosol der PCs vorkommt, ein Befund, der sich durch unsere Daten nicht erhärten lässt.

Da Ferritin in PCs nicht vorkommt, und *MtFt* in PCs ubiquitär verteilt ist, scheiden diese Funktionen für die diskreten Spots der Wildtyp-PC aus. Es muss daher angenommen werden, dass es sich hier um einen weiteren, bislang unbeschriebenen Eisenspeicher in Purkinjellen handelt.

Die erhöhte Gesamtkonzentration von Eisen in *Lurcher* lässt sich durch den in Folge der Dauerdepolarisation stark erhöhten ATP-Verbrauch und die damit verbundene vermehrte Produktion von Fe-haltigen Enzymen der Atmungskette erklären. Die Reduktion der Eisenspots in *Lc/+* stützt die aufgestellte Hypothese der unbekanntenen Eisenspeicher, denn ein erhöhter Eisenbedarf lässt einen Abbau der Speicher und eine Zunahme des in Transport befindlichen Eisens erwarten.

Möglicherweise ist mit dieser Umverteilung und Mobilisierung des Eisens während der Degeneration in *Lc/+* auch ein Anstieg freien Eisens verbunden, das durch seine Redoxaktivität besonders zellschädigend wirkt. Diese, durch die hier dargestellten Ergebnisse, neu aufgeworfenen Fragen könnten durch nachfolgende immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis von Eisentransportern (*DMT-*

---

1,*MTP1*) in *Lc/+* untersucht werden. Ein Nachfolgeprojekt mit Hilfe der XANES-Methode könnte zudem Aufschlüsse über den Oxidationszustand des Fe in *Lc/+* geben.

#### 4.3.2 Zink

Die vielfältigen Funktionen des Zinks spiegeln sich in der ubiquitären, intrazellulären Verteilung wieder. Zinkfinger-Proteine im Zellkern(69), Metallothioneine (MTs) zur Speicherung im Cytosol(11) und präsynaptische Vesikel an der Zellmembran(10) enthalten das Spurenelement.

Die *Lurcher*-PC wies eine um 40% höhere Zinkkonzentration als die Wildtyp-PC auf, wobei auch hier durch SXRF keine Differenzierung von gebundenem oder freiem Zink möglich ist. In Zusammenschau mit den Timm-Ergebnissen könnte man aber annehmen, dass es sich hier überwiegend um gebundenes (also „ungefährliches“) Zink handelt, da die verbliebenen PCs keine deutlichen Unterschiede zum Wildtyp zeigten. Aufgrund der bereits erwähnten Unwägbarkeiten beim Vergleich verschiedener Timm-Proben in Bezug auf reproduzierbare Färbintensitäten ist dies allein jedoch kein besonders starkes Indiz.

Die erhöhten Zinkkonzentrationen in *Lc/+* lassen sich durch die Daueraktivität des mutierten *GluRd2<sup>Lc</sup>* erklären. Die Permeabilität von *GluRd2<sup>Lc</sup>* für Calcium und andere Kationen ist bewiesen(70) und es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Zink Calciumkanäle permeiert(3). Es ist daher möglich, dass auf diesem Wege erhöhte Mengen des Metalls in die *Lc/+* PC gelangen.

Physiologisch wird Zink in der Zelle schnell an die vorhandenen Metallothioneine gebunden(3), was die fehlende Sichtbarkeit in den Timm-Färbungen erklären könnte. Zur Überprüfung dieser Annahme könnte der Zeitverlauf einzelner MTs in *Lurcher*-PCs untersucht werden.

---

Alternativ dazu könnte Zink im Rahmen des Zelluntergangs auch massiv aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Die vorliegenden Ergebnisse geben allerdings keine Hinweise für diese Annahme.

#### 4.3.3 Kupfer

Im Surface-Plot für Kupfer fiel zunächst auf, dass der Zellkern eine deutlich niedrigere Konzentration aufwies. Dies erscheint aufgrund seines Hauptvorkommens in den cytosolischen *SODs* nachvollziehbar.

Die fast homogene Verteilung in der *Lurcher-PC* spricht dafür, dass der Zellkern sich hier bereits in Auflösung befindet (genau wie es bei einer TUNEL-positiven Zelle sein sollte). Die beobachtete allgemeine Konzentrationserhöhung um fast das 2,5fache lässt einen erhöhten Kupferbedarf der Zelle vermuten. Ein Einstrom durch den *GluR2D* Rezeptor erscheint unwahrscheinlich, da freies Kupfer im Körper und vor allem im Gehirn praktisch nicht vorkommt. Die Upregulation der kupferhaltigen *CuZnSOD* wäre aufgrund des erhöhten oxidativen Stresses naheliegend, ließ sich in immunhistologischen Versuchen in unserem Labor aber nicht zeigen. Eine mögliche Quelle der Kupfererhöhung ist das Caeruloplasmin, das in *PCs* vorkommt und nicht nur durch seine Ferrioxidasefunktion für die Oxidation und Transport zweiwertigen Eisens unerlässlich ist, sondern auch an der Beseitigung reaktiver Oxygen Spezies beteiligt zu sein scheint(71).

#### 4.3.4 Mangan

Physiologisch liegt vermutlich ein großer Anteil des vergleichsweise gering konzentrierten Mangans in Form der mitochondrialen *MnSOD* vor.

Durch den geringen Signal-Rausch-Abstand der Spektren für Mangan ist diese Kompartimentierung im Wildtyp nicht darstellbar.

Im Gegensatz dazu zeigt die *Lurcher-PC* nicht nur einen moderaten (27%) Mn-Anstieg,

---

sondern außerdem auch ein stark differierendes Verteilungsmuster.

Im Kontext chronischer Depolarisation der *Lc/+* PCs ist auch hier, wie im Falle von Cu und Zn, mit einer Abwehrreaktion der Zelle in Form verstärkter MnSOD-Produktion zu rechnen, da der erhöhte ATP-Bedarf vermehrt zur Radikalbildung führt.

Eine solche Upregulation der MnSOD in *Lc/+* konnte von Vogel 2007(72) nachgewiesen werden.

Die in der *Lc/+* PC sichtbaren Mangan-Spots mit einem Durchmesser von 100-500nm könnten demnach den erhöhten mitochondrialen Mn-Gehalt widerspiegeln.

#### **4.4 Spurenelemente und Neurodegeneration**

Basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen Daten und im Kontext der Literatur ist ein ursächlicher Zusammenhang zwischen den erhöhten Konzentrationen der Elemente Cu, Fe, Mn und Zn und dem Untergang der Purkinjezellen in *Lurcher* nicht ableitbar.

Vielmehr zeichnet sich durch die Ergebnisse ab, dass ein Konzentrationsanstieg dieser Elemente viel wahrscheinlicher als eine Schutzreaktion gegen dauerhafte Überlastung und den damit verbundenen, oxidativen Stress darstellt. Erst in zweiter Linie, wenn die verstärkte Abwehrreaktion unzureichend wird, um das Überleben der Zelle zu sichern, wirken diese Elemente durch Umverteilung und vermehrte Freisetzung aus enzymgebundenen Formen möglicherweise selbst zytotoxisch und beschleunigen durch ihre Redoxaktivität den Abbauvorgang.

Auch wenn sich die primären Ursachen menschlicher, neurodegenerativer Erkrankungen mit erhöhten Elementkonzentrationen vom Rezeptordefekt in *Lc/+* unterscheiden, so unterliegen sie dennoch der selben, funktionellen Dichotomie dieser Elemente: Schutz vor und Beteiligung am Zelltod.

Aus diesem Grund könnten die hier dargestellten Ergebnisse erklären, warum Versuche, diese Erkrankungen mit Chelatoren zu behandeln, nur mäßigen Erfolg zeigten(73). Obwohl zum Beispiel Zink und Kupfer die A $\beta$ -Plaques beim Morbus Alzheimer stabilisieren(40), werden beide Elemente ebenso benötigt, um Radikale in Cytosol und Mitochondrien abzubauen. Ein Entzug dieser Metalle durch Chelatoren

---

würde also nach Verbrauch der nur geringgradig vorhandenen, intrazellulären „Vorräte“ eine Steigerung des oxidativen Stresses bewirken. Welche dieser beiden „Funktionen“ in welcher Phase überwiegt, hängt von der jeweils aktuellen Zustandsform des Elements ab.

## 5. Zusammenfassung

Spurenelemente sind im menschlichen Organismus von essentieller Bedeutung und unterliegen einer hochpräzisen Homöostase. Während zu hohe Blut- bzw. Gewebekonzentrationen toxisch wirken, ist eine Grundversorgung in geringsten Mengen essentiell für die Synthese lebenswichtiger Enzyme.

Im neurowissenschaftlichen Bereich mehrten sich in den letzten Jahren die Hinweise für einen Zusammenhang zwischen neurodegenerativen Erkrankungen und der Dysregulation einiger Spurenelemente. Ein *ursächlicher* Zusammenhang konnte jedoch bis auf wenige, genetisch determinierte Erkrankungen nicht aufgedeckt werden.

Um die Rolle der Spurenelemente bei neuronalem Zelluntergang näher zu charakterisieren, wurde die räumliche Verteilung dieser an einem Tiermodell für oxidativen Stress und Neurodegeneration (*Lurcher*) dargestellt. Hierfür kamen zwei verschiedene Ansätze zur Anwendung, die die wichtigsten in Frage kommenden Elemente schon in geringsten Konzentrationen bei subzellulärer, räumlicher Auflösung im Gewebe darstellen können.

Mit Hilfe der Timm-AMG Methode, die auf den Nachweis von Zn begrenzt ist, wurde zunächst der Konzentrationsverlauf und das Verteilungsmuster von Zn während der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns im Wildtyp untersucht. Es wurde deutlich, dass die cytosolische Zinkkonzentration am Endpunkt der Purkinjezellentwicklung (p22) kurz ansteigt, um sich danach im adulten Tier unterhalb des maximalen Niveaus zu stabilisieren. Diese Dynamik während der Entwicklung indiziert eine funktionelle Beteiligung des Zn während der Migrations- und Reifungsphase des Kleinhirns, die etwa in diesem Alter beendet ist. Im Vergleich zwischen Wildtyp und *Lurcher*-Kleinhirn ließen sich durch Timm-AMG keine relevanten Abweichungen der Zinkkonzentration zeigen.

---

Mit Hilfe der Röntgen-Fluoreszenz-Spektroskopie (SXRF) konnten in Pilotmessungen erstmals in Gewebeschnitten die subzellulären Verteilungsmuster der Elemente Cu, Fe, Mn und Zn mit einer Ortsauflösung von 150 nm Pixeldurchmesser grafisch dargestellt werden. Hier zeigte sich, dass es im *Lurcher*-Kleinhirn nicht nur zu einer Dislokation (Cu, Fe, Mn) sondern auch zu einem deutlichen Konzentrationsanstieg auf das bis zu 2.7-fache dieser Metalle in vom Zelluntergang betroffenen Purkinjezellen kommt.

Darüberhinaus stellten bislang unbeschriebene Eisenspeicher in der Wildtyp-Purkinjezelle einen überraschenden Fund dar. Deren Genese und Beschaffenheit muss jedoch noch in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Der in dieser Arbeit auf völlig neue Weise gemessene und beobachtete Konzentrationsanstieg der untersuchten Elemente ist vereinbar mit den Ergebnissen eingangs besprochener, aktueller Literatur und repräsentiert wohl eher eine primäre Schutzreaktion gegen oxidativen Stress. Erst in zweiter Linie, wenn die verstärkte Abwehrreaktion unzureichend wird, um das Überleben der Zelle zu sichern, wirken diese Elemente durch Umverteilung und vermehrte Freisetzung aus enzymgebundenen Formen möglicherweise selbst zytotoxisch und beschleunigen durch ihre Redoxaktivität den Abbauvorgang.

## 5.1 Summary

Trace elements and their precise homeostasis are an essential part of human physiology. While hyperemia in blood and tissues leads to toxic effects, the lack of trace elements prevents synthesis of important enzymes.

Increasing numbers of neuroscientific publications over the last decade connected neurodegenerative disorders with abnormal levels of metals like Copper or Zinc. However, except from some rare genetic disorders no direct link between neuronal cell death and trace elements has been established so far.

To gain new insights into the role of trace elements in neuronal death, two methods were selected and refined. Key prerequisite for both was high sensitivity for the elements of interest and the possibility to perform 2D-imaging on a subcellular level.



---

The Lurcher mouse was chosen as a model for oxidative stress and neuronal cell death. Using the Zn-limited Timm-AMG technique, both concentration and distribution time patterns were analyzed in postnatal Wildtype cerebella. After a short increase at the endpoint of Purkinje cell (PC) development (p22) Zinc levels decreased to a lower level than seen before this point. These findings indicate an involvement of Zn in the ceasing cerebellar migration and maturation processes.

Concerning the Lurcher cerebellum, no significant changes in Zinc levels or distribution were found using Timm-AMG.

By using Synchrotron X-ray Fluorescence spectroscopy (SXRF) we were able to visualize subcellular distribution of Cu, Fe, Mn and Zn in brain slices for the first time. With a spatial resolution of 150 nm it could be shown that those elements (Cu, Fe, Mn) dislocate in Lurcher-PCs. Additionally, the concentrations of all four metals increased up to 2.7-fold.

Surprisingly, we found a new type of Iron storage in Wildtype-PCs. However, its origin and properties have to be elucidated in future investigations.

Taking current literature into account our findings suggest that the increasing levels of trace elements are rather an action of self-defense against oxidative stress than the cause of it. Only as a consequence of this (unsuccessful) attempt those elements dislocate, could possibly become cytotoxic and accelerate the degenerative process.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* 1998;158(1):47-52.
2. Burdette SC, Lippard SJ. Meeting of the minds: metalloneurochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(7):3605-10.
3. Frederickson CJ, Koh J, Bush AI. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(6):449-62.

- 
4. Doraiswamy PM, Finefrock AE. Metals in our minds: therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* 2004;3(7):431-4.
  5. Bäurle J, Kucera J, Frischmuth S, Lambertz M, Kranda K. Dynamics of trace element concentration during development and excitotoxic cell death in the cerebellum of Lurcher mutant mice. *Brain Pathol* 2009 Okt;19(4):586-595.
  6. Hellmich HL, Eidson KA, Capra BA, Garcia JM, Boone DR, Hawkins BE, Uchida T, Dewitt DS, Prough DS. Injured Fluoro-Jade-positive hippocampal neurons contain high levels of zinc after traumatic brain injury. *Brain Res* 2007;1127(1):119-26.
  7. Takeda A, Suzuki M, Okada S, Oku N. <sup>65</sup>Zn localization in rat brain after intracerebroventricular injection of <sup>65</sup>Zn-histidine. *Brain Res* 2000 Apr;863(1-2):241-4.
  8. Sheline CT, Ying HS, Ling CS, Canzoniero LMT, Choi DW. Depolarization-induced <sup>65</sup>zinc influx into cultured cortical neurons. *Neurobiol Dis* 2002;10(1):41-53.
  9. Colvin RA, Davis N, Nipper RW, Carter PA. Zinc transport in the brain: routes of zinc influx and efflux in neurons. *J Nutr* 2000;130(5S Suppl):1484S-7S.
  10. Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(25):14934-9.
  11. Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr* 2000;130(5S Suppl):1455S-8S.
  12. Lee J, Kim J, Palmiter RD, Koh J. Zinc released from metallothionein-iii may contribute to hippocampal CA1 and thalamic neuronal death following acute brain injury. *Exp Neurol* 2003;184(1):337-47.

- 
13. Ueno S, Tsukamoto M, Hirano T, Kikuchi K, Yamada MK, Nishiyama N, Nagano T, Matsuki N, Ikegaya Y. Mossy fiber Zn<sup>2+</sup> spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits. *J Cell Biol* 2002;158(2):215-20.
  14. Paoletti P, Ascher P, Neyton J. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* 1997;17(15):5711-25.
  15. Li Y, Hough CJ, Frederickson CJ, Sarvey JM. Induction of mossy fiber --> Ca3 long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn<sup>2+</sup>. *J Neurosci* 2001;21(20):8015-25.
  16. Coulter DA. Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties. *Int Rev Neurobiol* 2001;45:237-52.
  17. Kim YH, Kim EY, Gwag BJ, Sohn S, Koh JY. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience* 1999;89(1):175-82.
  18. Domínguez MI, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ. Zinc chelation during non-lesioning overexcitation results in neuronal death in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 2003;116(3):791-806.
  19. Lavoie N, Peralta MR, Chiasson M, Lafortune K, Pellegrini L, Seress L, Tóth K. Extracellular chelation of zinc does not affect hippocampal excitability and seizure-induced cell death in rats. *J. Physiol. (Lond.)* 2007 Jan;578(Pt 1):275-89.
  20. Berr C, Wancata J, Ritchie K. Prevalence of dementia in the elderly in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005 Aug;15(4):463-71.

- 
21. Bush AI, Pettingell WHJ, Paradis MD, Tanzi RE. Modulation of A beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J Biol Chem* 1994;269(16):12152-8.
  22. Huang X, Atwood CS, Moir RD, Hartshorn MA, Vonsattel JP, Tanzi RE, Bush AI. Zinc-induced Alzheimer's Aβ<sub>1-40</sub> aggregation is mediated by conformational factors. *J. Biol. Chem* 1997 Okt;272(42):26464-70.
  23. Ritchie CW, Bush AI, Masters CL. Metal-protein attenuating compounds and Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13(12):1585-92.
  24. Lee J, Friedman JE, Angel I, Kozak A, Koh J. The lipophilic metal chelator DP-109 reduces amyloid pathology in brains of human beta-amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol Aging* 2004;25(10):1315-21.
  25. MedizInfo®: Eisenstoffwechsel [Internet]. [o. J.];[zitiert 2010 Mai 4 ] Available from: <http://www.medizinfo.de/haematologie/anatomie/eisenstoffwechsel.shtml>
  26. Andrews NC. Molecular control of iron metabolism. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18(2):159-69.
  27. Salazar J, Mena N, Núñez MT. Iron dyshomeostasis in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl* 2006;(71):205-13.
  28. Jeong SY, David S. Age-related changes in iron homeostasis and cell death in the cerebellum of ceruloplasmin-deficient mice. *J Neurosci* 2006 Sep;26(38):9810-9.
  29. Leibold EA, Gahring LC, Rogers SW. Immunolocalization of iron regulatory protein expression in the murine central nervous system. *Histochem Cell Biol* 2001 März;115(3):195-203.

- 
30. Santambrogio P, Biasiotto G, Sanvito F, Olivieri S, Arosio P, Levi S. Mitochondrial ferritin expression in adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 2007 Nov;55(11):1129-37.
  31. Kaur D, Andersen J. Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Res Rev* 2004;3(3):327-43.
  32. Uversky VN, Li J, Fink AL. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J. Biol. Chem* 2001 Nov;276(47):44284-44296.
  33. Lo Bianco C, Schneider BL, Bauer M, Sajadi A, Brice A, Iwatsubo T, Aebischer P. Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2004 Dez;101(50):17510-5.
  34. Li J, Zhu M, Rajamani S, Uversky VN, Fink AL. Rifampicin inhibits alpha-synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chem. Biol* 2004 Nov;11(11):1513-21.
  35. Macreadie IG. Copper transport and Alzheimer's disease. *Eur. Biophys. J* 2008 März;37(3):295-300.
  36. Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr* 1996 Mai;63(5):797S-811S.
  37. Weiss KC, Linder MC. Copper transport in rats involving a new plasma protein. *Am. J. Physiol* 1985 Juli;249(1 Pt 1):E77-88.
  38. Bertini I, Rosato A. Menkes disease. *Cell. Mol. Life Sci* 2008 Jan;65(1):89-91.

- 
39. Healy J, Tipton K. Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm* 2007;114(6):777-81.
40. Barnham KJ, Bush AI. Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Current Opinion in Chemical Biology* 2008 Apr;12(2):222-8.
41. Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Schneider JA, Wilson RS, Scherr PA. Dietary copper and high saturated and trans fat intakes associated with cognitive decline. *Arch. Neurol* 2006 Aug;63(8):1085-8.
42. Schilsky ML. Wilson disease: current status and the future. *Biochimie* 2009 Okt;91(10):1278-1281.
43. El Meskini R, Crabtree KL, Cline LB, Mains RE, Eipper BA, Ronnett GV. ATP7A (Menkes protein) functions in axonal targeting and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci* 2007 März;34(3):409-21.
44. Takeda A. Manganese action in brain function. *Brain Res Brain Res Rev* 2003;41(1):79-87.
45. Dobson AW, Erikson KM, Aschner M. Manganese neurotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2004 März;1012:115-128.
46. Michalke B, Halbach S, Nischwitz V. Speciation and toxicological relevance of manganese in humans. *Journal of Environmental Monitoring: JEM* 2007 Juli;9(7):650-6.
47. Yokel RA. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis* 2006 Nov;10(2-3):223-53.

- 
48. Phillips RJS. "Lurcher", a new gene in linkage group XI of the house mouse. *J Genet.* 1960;57:35-42.
  
  49. Caddy KW, Biscoe TJ. Structural and quantitative studies on the normal C3H and Lurcher mutant mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1979;287(1020):167-201.
  
  50. Heckroth JA. A quantitative morphological analysis of the cerebellar nuclei in normal and lurcher mutant mice. II. Volumetric changes in cytological components. *J Comp Neurol* 1994;343(1):183-92.
  
  51. Vogel MW, McInnes M, Zanjani HS, Herrup K. Cerebellar Purkinje cells provide target support over a limited spatial range: evidence from lurcher chimeric mice. *Brain Res Dev Brain Res* 1991;64(1-2):87-94.
  
  52. Zanjani SH, Selimi F, Vogel MW, Haeberle A, Boeuf J, Mariani J, Bailly YJ. Survival of interneurons and parallel fiber synapses in a cerebellar cortex deprived of Purkinje cells: studies in the double mutant mouse *Grid2Lc/+;Bax(-/-)*. *J Comp Neurol* 2006;497(4):622-35.
  
  53. Zuo J, De Jager PL, Takahashi KA, Jiang W, Linden DJ, Heintz N. Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* 1997;388(6644):769-73.
  
  54. Takayama C, Nakagawa S, Watanabe M, Mishina M, Inoue Y. Developmental changes in expression and distribution of the glutamate receptor channel delta 2 subunit according to the Purkinje cell maturation. *Brain Res Dev Brain Res* 1996;92(2):147-55.
  
  55. Kashiwabuchi N, Ikeda K, Araki K, Hirano T, Shibuki K, Takayama C, Inoue Y, Kutsuwada T, Yagi T, Kang Y. Impairment of motor coordination, Purkinje cell

- 
- synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. *Cell* 1995;81(2):245-52.
56. Kurihara H, Hashimoto K, Kano M, Takayama C, Sakimura K, Mishina M, Inoue Y, Watanabe M. Impaired parallel fiber-->Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor delta2 subunit. *J Neurosci* 1997;17(24):9613-23.
57. Yuzaki M. The delta2 glutamate receptor: 10 years later. *Neurosci Res* 2003;46(1):11-22.
58. Rubinsztein DC, DiFiglia M, Heintz N, Nixon RA, Qin Z, Ravikumar B, Stefanis L, Tolkovsky A. Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* 2005 Apr;1(1):11-22.
59. Yue Z, Horton A, Bravin M, DeJager PL, Selimi F, Heintz N. A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron* 2002;35(5):921-33.
60. Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* 1999 Sep;14(3):180-98.
61. Bäurle J, Kranda K, Frischmuth S. On the variety of cell death pathways in the Lurcher mutant mouse. *Acta Neuropathol* 2006 Dez;112(6):691-702.
62. Frischmuth S, Kranda K, Bäurle J. Translocation of cytochrome c during cerebellar degeneration in Lurcher and weaver mutant mice. *Brain Res Bull* 2006;71(1-3):139-48.
63. TIMM F. [Histochemical demonstration of copper in the brain.]. *Z Zellforsch Microsk*



---

Anat Histochem 1961;2:332-41.

64. Danscher G, Stoltenberg M. Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles. *Prog Histochem Cytochem* 2006;41(2):57-139.
65. Schwinger J. On the Classical Radiation of Accelerated Electrons. *Phys. Rev.* 1949 Juni;75(12):1912.
66. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol* 1992 Nov;119(3):493-501.
67. Dumesnil-Bousez N, Sotelo C. Early development of the Lurcher cerebellum: Purkinje cell alterations and impairment of synaptogenesis. *J. Neurocytol* 1992 Juli;21(7):506-529.
68. Valente T, Auladell C. Expression pattern of Zac1 mouse gene, a new zinc-finger protein that regulates apoptosis and cellular cycle arrest, in both adult brain and along development. *Mech. Dev* 2001 Okt;108(1-2):207-211.
69. Aruga J. The role of Zic genes in neural development. *Mol. Cell. Neurosci* 2004 Juni;26(2):205-221.
70. Ikeno K, Yamakura T, Yamazaki M, Sakimura K. The Lurcher mutation reveals Ca<sup>2+</sup> permeability and PKC modification of the GluR[delta] channels. *Neuroscience Research* 2001 Okt;41(2):193-200.
71. Texel SJ, Xu X, Harris ZL. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Biochem. Soc. Trans* 2008 Dez;36(Pt 6):1277-1281.

---

72. McFarland R, Blokhin A, Sydnor J, Mariani J, Vogel MW. Oxidative stress, nitric oxide, and the mechanisms of cell death in Lurcher Purkinje cells. *Dev Neurobiol* 2007 Juli;67(8):1032-1046.

73. Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane S, Mastwyk M, MacGregor L, Kiers L, Cherny R, Li Q, Tammer A, Carrington D, Mavros C, Volitakis I, Xilinas M, Ames D, Davis S, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch. Neurol* 2003 Dez;60(12):1685-91.

## 7. Abkürzungen

### Abkürzungen Definitionen

GluR $\delta$ 2	Glutamat Rezeptor Delta 2
Ccs	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p
Cox	Cyclooxygenase
GPX	Glutathion-Peroxidase
LTP	Langzeitpotenzierung
MT	Metallothionein
MtFt	Mitochondriales Ferritin
ML	Molekularschicht
MAO	Monoaminoxidase
PD	Morbus Parkinson
PF	Parallelfasern
PC(s)	Purkinjezelle(n)
PCL	Purkinjezellschicht
SOD	Superoxiddismutase
SXRF	Synchrotron-X-Ray-Fluorescence
TF	Transferrin
TFR	Transferrinrezeptor
Wm	Weiße Substanz
XANES	X-ray absorption near-edge structure

---

## 8. Anhang

### 8.1 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Priv-Doz. Jörg Bäurle danke ich für die Überlassung des Themas. Vor allem aber möchte ich ihm für die herausragende Betreuung, die unendliche Geduld, die Heranführung an wissenschaftliches Arbeiten und verschiedene Techniken im Labor und die stetige Verfügbarkeit bei Fragen danken. Nie war ein Moment ungünstig, eine Frage zu einfach oder eine Idee zu abwegig, stets konnte man auf seinen Rat und seine Unterstützung zählen.

Mein Dank gilt ebenfalls Helmut Abt und meiner Mutter Ilse Brandhorst-Abt für das Korrekturlesen, vor allem aber für die Motivation zum und die Unterstützung während des Studiums – jederzeit und in allen Lebenslagen.

Meinem guten Freund Peter Werner für wissenschaftliche Diskussionen.

Vor allem danke ich meiner lieben Frau Meike dafür, während der gesamten Zeit an meiner Seite gestanden zu haben, für die endlose Geduld beim Zuhören, fürs Korrekturlesen und für die vielen aufmunternden Worte bei Rückschlägen.

### 8.2 Lebenslauf

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

---

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

---

### 8.3 Publikationsliste

**BORGMANN M**, KUEHBACHER M, BOHIC S, KRANDA K, BAEURLE J. Subcellular mapping of trace elements in dying Purkinje cells of Lurcher mutants. Program No. 56.10. 2009 Neuroscience Meeting Planner. Chicago, IL: Society for Neuroscience, 2009. Online.

**BORGMANN M** FRISCHMUTH S, BAEURLE J. On the chronological course of zinc distribution in the developing mouse cerebellum. Program No. 230.21. 2009 Neuroscience Meeting Planner. Washington, D.C: Society for Neuroscience, 2008. Online.

### 8.4 Erklärung

„Ich, Markus Borgmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Spurenelemente und Neurodegeneration selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift