

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

DISSERTATION

Neuroprotektion und Neurogenese im 6-OHDA-Parkinson-Modell der Ratte
nach therapeutischer Intervention

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

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Kai Hosmann
aus Köln

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Kupsch
2. Prof. Dr. Alexander Storch
3. Prof. Dr. Johannes Schwarz

Datum der Promotion: 26.06.2009

INHALTSVERZEICHNIS

Abstract	4
Einleitung und Zielstellung	5
Material und Methoden	6
Ergebnisse	7
Diskussion	8
Referenzen	13
Publikationsliste	16
Erklärung über den Anteil an den Publikationen	17
Lebenslauf	18
Erklärung über die Selbstständigkeit	19
Danksagung	20

ABSTRACT

Der Morbus Parkinson ist durch den Untergang dopaminergener Zellen in der Substantia nigra, pars compacta (SNc) mit einem konsekutiven Dopamin(DA)defizit gekennzeichnet. Letzteres bedingt eine Überaktivität des Nucleus subthalamicus (STN), zentrales Kerngebiet der Basalganglien, die mit verstärkten glutamatergen Projektionen zur Substantia nigra, pars reticularis (SNr) einhergeht. Diese führen zu einer Inhibition thalamokortikaler Projektionen und sind darüber hinaus mitverantwortlich für den fortschreitenden nigralen Zellverlust. Es stellt sich also die Frage, inwieweit eine therapeutische Reduktion der pathologischen Überaktivität des STN einerseits die Dysregulation in der thalamokortikalen Übertragung balancieren und andererseits die glutamat-bedingte Neurotoxizität vermindern kann. Tatsächlich führen die ablativische Läsion und hochfrequente Tiefenhirnstimulation des STN zu einer dramatischen Besserung klinischer Symptome beim Menschen. Fokus dieser Arbeit war die Untersuchung eines potentiell protektiven oder restaurativen Effekts der ablativen STN-Läsion auf die SNc in der nativen und mittels 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) DA-depletierten Ratte.

Wir haben zeigen können, dass die ablativische STN-Läsion in der Ratte zu einer motorischen Besserung, untersucht durch amphetamininduziertes Rotationsverhalten, führt. Dieser Effekt konnte allenfalls durch eine bedingt oder funktionell neuroprotektive Wirkung der STN-Läsion erklärt werden: Eine vorhergehende STN-Läsion verzögerte zwar den Verlust von nigraler Zellfunktion (gemessen mit Tyrosinhydroxylase (TH), Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese), hatte dabei aber keinen Einfluss auf die generelle Zelldegeneration (dargestellt durch Fluorogold). Diese Ergebnisse gingen einher mit einer Modulation des degenerativen Programms (gezeigt durch veränderte Expression und Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun), in dem wesentliche Schritte neurodegenerativer Kaskaden verzögert wurden.

Diese Diskrepanz zwischen einer gesteigerten Zahl aktiver Zellen und gleichzeitig nicht beeinflusstem Zellsterben warf die Frage nach läsionsvermittelter veränderter nigraler Neurogenese auf. Hinsichtlich der Frage nach generellem neurogenetischen Potential der SN zeigte eine weitere Studie, dass etablierte Stimuli wie ein „*enriched environment*“ oder körperliche Aktivität zwar nicht zu neuronaler, wohl aber zu gesteigerter gliärer Proliferation führen können, sowohl bei gesunden als auch bei 6-OHDA-lädierten Tieren. Diese Veränderungen im Mikroenvironment äußerten sich auch im motorischen Verhalten durch eine Verbesserung des Rotationsverhaltens bei Tieren, die Stimuli ausgesetzt waren.

In der Übertragung dieser Ergebnisse auf die Fragestellung, welche Auswirkungen eine STN-Läsion auf die SN hat, konnten wir zeigen, dass auch eine STN-Läsion eine gesteigerte gliäre Neogenese ergab, die allerdings vorübergehend war und kurzfristig nach der Läsion auftrat. Sie macht die sensiblen Reaktionen von Glia und Mikromilieu deutlich, die exogene Stimuli hervorrufen, und kann möglicherweise dazu beitragen, den transienten Effekt der STN-Läsion auf motorische Funktionen zu erklären.

Insgesamt ergibt sich eine Vielgestaltigkeit von Neurodegeneration und Neuroprotektion, bei der neben alleinigem neuronalen Überleben auch die neuronale Aktivität und gliäre Reaktion sowie die komplexe Zusammensetzung des jeweiligen Mikromilieus zu berücksichtigen sind.

EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Die Parkinsonerkrankung zählt zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen. Gekennzeichnet ist sie durch einen fortschreitenden Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra, pars compacta (SNc). Durch den hieraus resultierenden Dopaminmangel kommt es zu einem Transmissionsgleichgewicht in den Basalganglien mit Über- bzw. Unteraktivität einzelner Kerngebiete. Diese Imbalance bedingt die für die Krankheit typischen motorischen, vegetativen und psychischen Symptome.

Der Nucleus subthalamicus besitzt als Kerngebiet der Basalganglien glutamaterge Efferenzen zur Substantia nigra sowie zum Globus Pallidus, pars interna (GPi). Bei Dopaminmangel ist er vermindert inhibiert und damit überaktiv. Seine überschießende glutamaterge Erregung bewirkt zum einen eine verstärkte Inhibition thalamokortikaler Bahnen, zum anderen wirkt sie exzitotoxisch. Da nigrale Neuronen äußerst empfindlich gegenüber exzitotoxischen Einflüssen sind, ist davon auszugehen, dass ein überaktiver STN zur Krankheitsprogression beiträgt.

Eine Ausschaltung des STN bewirkt folglich eine prompte Besserung der Symptomatik, worin der Ansatzpunkt der Tiefenhirnstimulation liegt, die seit gut zehn Jahren zur Standardtherapie des medikamentenrefraktären Spätstadiums des Morbus Parkinson gehört. Ein Aufhalten der Krankheitsprogression durch Ausschaltung der exzitotoxischen Einflüsse konnte in klinischen Langzeitstudien nicht gezeigt werden (*Hilker et al., 2005*). Jedoch kam es zu einer deutlichen Verzögerung im klinischen Verlauf, die sich auch nach Jahren noch durch eine reduzierte Medikamentendosis und reduzierte Symptomatik äußert (*Krack et al., 2003; Rodriguez-Oroz et al., 2005*).

Zu dieser Beobachtung gesellen sich tierexperimentelle Daten an Parkinsoniermodellen, die belegen, dass pharmakologische Antagonisierung (*Blandini et al., 2001*) oder ablative Inhibition des STN (*Carvalho und Nikkah, 2001; Nakao et al., 1999; Piallat et al., 1996*) neuroprotektive Effekte vermittelt, die die Reduktion dopaminerg aktiver Neuronen vermindert. Diese können grundsätzlich auf drei verschiedene Mechanismen zustande kommen: zuerst durch vermehrtes Zellüberleben, also eine durch STN-Läsion vermittelte echte Neuroprotektion; zweitens durch funktionelle Effekte wie beispielsweise eine vermehrte, hochregulierte TH-Aktivität, bei der zwar nicht die absolute Zellzahl, wohl aber die Zahl der aktiven, Dopamin produzierenden Zellen erhöht ist; und drittens durch neu gebildete aktive Neuronen, also Neurogenese.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die weitere Aufklärung der Effekte, die eine Ausschaltung des STN und äußere Einflüsse auf das Zellverhalten der Substantia nigra haben, und zwar sowohl auf Zellsterben wie auf Zellneubildung.

Die ersten beiden Studien untersuchen, ob die nach STN-Läsion in Form gesteigerter Zellaktivität beschriebene Neuroprotektion auch im eigentlichen Zellüberleben und in Langzeituntersuchungen aufzufinden ist. Durch die Markierung nigraler Neuronen mit Fluorogold zusätzlich zu TH, das lediglich dopaminerg aktive Phänotypen darstellt, konnte auch das generelle neuronale Überleben untersucht werden. Darüber hinaus dient die Betrachtung auf Ebene der Transkriptionsfaktoren dazu, genauere Erkenntnisse über die zugrunde liegenden Mechanismen der Zelldegeneration und über die Einbindung in neurodegenerative Kaskaden zu gewinnen. Wir fokussieren uns auf die Auswirkungen einer STN-Läsion auf Expression und Phosphorylierung von c-Jun, das in neurodegenerativen Prozessen eine Schlüsselrolle einnimmt.

Die dritte und vierte Studie beschäftigen sich mit Neuroneogenese und zellulärer Plastizität in der Substantia nigra. Da hier über Zellneubildungsvorgänge noch weitgehende Unklarheit herrscht - Neurogenese konnte bislang nicht gezeigt werden -, stellte sich für uns vorerst die Frage, ob und inwiefern zelluläre Plastizität in der Substantia nigra überhaupt möglich sind, und wie sie durch Änderungen der Mikroumgebung im Sinne von Dopaminmangel bei 6-OHDA-Läsion und Wegfall des glutamatergen Inputs bei STN-Läsion moduliert werden kann.

In der dritten Studie werden diesbezüglich etablierte Stimuli in Form von körperlicher Aktivität und ein anregendes Umfeld („enriched environment“) angewandt, die für andere Hirnregionen als neurogen beschrieben wurden (*Van Praag et al., 1999; Kempermann et al., 1997; Steiner et al., 2004*).

Wie sich eine STN-Läsion auf Zellneubildung auswirkt, wird in Studie 4 untersucht.

MATERIAL UND METHODEN

Alle Untersuchungen wurden an männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Je nach Studie wurden sie stereotaktisch am Gehirn operiert, um eine Läsion des STN (Studie 1, 2, 4), nigrale Degeneration (1, 2, 3) oder Fluorogoldmarkierung (1, 2) zu induzieren. Außerdem wurden Verhaltenstests (1, 2, 3), physiologische Stimuli (3) und Bromodeoxyuridin(BrdU)-Injektionen zur Markierung neu gebildeter Zellen (3, 4) angewendet.

Nach Ende des jeweiligen Untersuchungszeitraums wurden die Tiere narkotisiert und durch transkardiale Perfusion von 0,9%iger Natriumchloridlösung, gefolgt von 4%iger Paraformaldehyd zur Fixierung, getötet. Das Gehirn wurde im Kryomicrotom in 30 µm dicke Scheiben geschnitten und histologisch aufgearbeitet.

Stereotaktische Operationen

Unter Natriumpentobarbital-Anästhesie wurden die Tiere stereotaktisch operiert, wobei die Läsions- bzw. Markersubstanzen durch eine rostfreie Stahlkanüle von 25 µm Weite injiziert wurden.

STN-Läsionen (1, 2, 4): In 0,9%iger Kochsalzlösung gelöste Ibotensäure wurde in den linken STN injiziert.

6-OHDA-Läsionen (1, 2, 3): Das retrograd über striatale Axone nigraler Zellen wirksame 6-OHDA wurde an vier festgelegten Punkten ins linke Striatum eingebracht.

Fluorogold (1, 2): Ebenfalls ins Striatum (beidseitig, an jeweils zwei Punkten) injiziert wurde der Zellmarker Fluorogold (zum von dort ausgehenden retrograd axonalen Transport in die Substantia nigra).

Haltung und Verhalten

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in einem 12-Stunden-Hell/Dunkel-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. *Physiologische Stimuli*: Für Studie 3 wurden die Tiere in einem „enriched environment“ (Van Praag et al., 1999) mit im Vergleich zu Standardbedingungen größerem Käfig, der unterschiedliche stimulierende Objekte enthielt, gehalten. Physische Aktivität wurde für 10-20 Minuten täglich auf einem Laufband (Rotarod) durchgeführt.

Rotationsverhalten: Motorisches Verhalten, das über das Ausmaß der nigralen Schädigung Auskunft gibt, wurde durch amphetamininduziertes Rotationsverhalten geprüft, bei dem die Umdrehungen der Tiere nach Amphetamininjektion in Rotameter-Schüsseln gezählt wurden.

Proliferationsmarker

Bromodeoxyuridin (BrdU), das Zellproliferation durch Einbau in die DNA markiert, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten an 3-10 aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal (50 mg/kg Körpergewicht) injiziert (Studie 3, 4).

Histologische Untersuchungen

Nissl-Färbung: Zur Beurteilung der Kanülenlage im Striatum und STN sowie des Ausmaßes der STN-Läsion wurden Nissl-Färbungen mit Cresylviolett von Schnitten der jeweiligen Regionen angefertigt. *Immunhistochemisch* dargestellt wurden: TH; c-Jun und phosphoryliertes c-Jun; c-Fos; BrdU; die gliären Marker GFAP, NG2 und Iba1; NeuN, anti-Doublecortin und CNPase als Marker unreifer oder reifer Neuronen. Zur Detektion apoptotischer Zellen wurde Terminal transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) durchgeführt.

Quantitative Auswertung:

Die markierten Zellen wurden licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt; jeweils drei Schnitte innerhalb definierter anatomischer Grenzen wurden für Studie 1 und 2 herangezogen, während Studie 3 und 4 stereologisch ausgewertet wurden. Für Doppeldarstellungen jeweiliger Substanzen wurde Immunfluoreszenz angewandt.

Statistik

Für die statistische Analyse wurden je nach Studie unterschiedliche varianzanalytische oder wenn nötig verwandte non-parametrische Methoden angewendet. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% ($p < 0,05$) festgelegt. Aufgrund ihrer nonparametrischen Verteilung wurde Studie 1 mit Rank-Tests (Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-Test) ausgewertet. Für die Studien 2, 3 und 4 wurden traditionelle Varianzanalysen (ANOVA) angewandt, an die Student's t-Tests, Student-Newman-Keuls-Tests (Studie 2) und Fisher-post-hoc-Tests (Studie 3 und 4) angeschlossen wurden.

ERGEBNISSE

Ibotensäureinjektionen in den Fluorogold-markierten Zellen in der SNc erbrachten einen über 75%igen Verlust subthalamischer Neurone.

Studie 1 – TH, Fluorogold und Rotationsverhalten nach STN-Läsion nach zwei und sechs Wochen

Die unilaterale striatale 6-OHDA-Läsion führte zu einem ipsilateralen Verlust TH-positiver Neurone in allen Gruppen. Nach zwei und sechs Wochen gab es einen signifikant geringeren Neuronenverlust bei STN-lädierten Tieren im Vergleich zu Kontroll- und scheinlädierten Tieren.

Die Anzahl Fluorogold-markierter Zellen als Marker für Zellüberleben ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Läsions- und Kontrollgruppe, weder nach zwei noch nach sechs Wochen. Das Rotationsverhalten war nach zwei und sechs Wochen in STN-lädierten Tieren signifikant vermindert gegenüber Kontrolltieren.

Studie 2 – Langzeituntersuchung

Die Daten aus Studie 1 wurden reproduziert und auf einen Untersuchungszeitraum von zwölf Wochen ausgeweitet.

Die Langzeituntersuchung ergab keinen signifikanten Unterschied mehr in der Zahl der TH-exprimierenden Neuronen bei STN-lädierten und Kontrolltieren nach zwölf Wochen. Auch das Rotationsverhalten war nach zwölf Wochen ohne signifikante Unterschiede.

– c-Jun-Verhalten

In der Kontrollgruppe fand sich die höchste Anzahl c-Jun-exprimierender Zellen am dritten Tag nach Läsion, von wo aus sie stetig bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach zwölf Wochen sank.

Nach vorhergehender STN-Läsion fiel die c-Jun-Expression nach drei Tagen signifikant geringer aus und erreichte ihr Maximum erst nach sieben Tagen (signifikant höher als nach drei Tagen). Von hier aus nahm sie kontinuierlich bis zum geringsten Wert nach zwölf Wochen ab.

Parallel dazu verhielt sich die Phosphorylierung von c-Jun.

Die absolute Zahl c-Jun-immunpositiver Zellkerne war zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als die p-c-Jun-immunpositiver Zellkerne. Doppelfärbungen zeigten, dass zwei Wochen nach 6-OHDA-Läsion in Kontrolltieren nahezu alle c-Jun-exprimierenden Zellen auch für p-c-Jun positiv waren. Demgegenüber waren es zu diesem Zeitpunkt nur etwa 67 % in STN-lädierten Tieren.

C-Fos konnte in keiner Gruppe und zu keinem Untersuchungszeitraum in der SN nachgewiesen werden.

Vereinzelte apoptotische Zellen konnten mit TUNEL-Färbung dargestellt werden. Jedoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede nach STN- oder 6-OHDA-Läsion.

Studie 3 – Nigrale Neogenese im Enriched Environment

Neuronale Marker (Doublecortin, NeuN, TH) wurden in keiner der Gruppen unter BrdU-positiven Zellen nachgewiesen.

Bei Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden, ließen sich in der Absolutzahl proliferierender Zellen keine Unterschiede zwischen 6-OHDA-lädierten und gesunden Tieren detektieren. Die größte Subpopulation machten bei nativen wie lädierten Tieren NG2-exprimierende Zellen aus, kleiner war der Anteil an GFAP und Iba-1.

6-OHDA-lädierte Tiere besaßen eine signifikant geringere Absolutzahl GFAP/BrdU-positiver Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Enriched environment und körperliche Aktivität wirkten sich in Form einer signifikanten Steigerung von BrdU-positiven Zellen in gesunden und sogar einer beinahe Verdopplung in 6-OHDA-lädierten Tieren aus, wobei der Zeitpunkt vier oder sieben Wochen nach Läsion keine Rolle spielte.

Auch das Rotationsverhalten verbesserte sich bei diesen Tieren nach sieben Wochen signifikant (nach vier Wochen ohne signifikanten Unterschied), während jedoch die TH-Expression unbeeinflusst blieb.

Enriched environment mit körperlicher Aktivität erhöhte die Proliferation NG2- und GFAP-positiver Zellen in gesunden Tieren deskriptiv, in lädierten Tieren auch signifikant. Auch Iba-1 positive Zellen in 6-OHDA-lädierten und gesunden Tieren waren nach *enriched environment* deskriptiv erhöht, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

Studie 4 – STN-Läsion und nigrale Plastizität

Nach unmittelbarer (d1-3) und längerer (d4-14) BrdU-Applikation war nach zwei Wochen eine signifikante Steigerung der Zahl neugebildeter Zellen in STN-lädierten Tieren im Vergleich zu schein- und nicht-lädierten Tieren zu verzeichnen. Nach früher Applikation war davon die Anzahl NG2-positiver Zellen signifikant erhöht, nach Applikation an den Tagen 4-14 dagegen verringert. NG2-positive Zellen koexprimierten den Astrozytenmarker S100 beta. Mikroglial gekennzeichnete Zellen waren im ersten Applikationsintervall unverändert, im zweiten signifikant geringer darstellbar.

Neuronale (Doublecortin, NeuN, TH) Marker sowie GFAP als astrozytärer und CNPase als oligodendrozytärer Marker wurden in keiner der Gruppen unter BrdU-positiven Zellen nachgewiesen.

Nach acht Wochen waren zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr erkennbar.

DISKUSSION

Die vorgestellten Studien demonstrieren, dass eine vorhergehende Läsion des Nucleus subthalamicus die 6-OHDA-Toxizität funktionell verzögert, d.h. der Aktivitätsverlust wird aufgehalten. Die eigentliche Degeneration wird dadurch nicht beeinflusst, wohl aber das degenerative Programm. Dieser Effekt spiegelt sich in einer Modulation intrazellulärer neurodegenerativer Signalkaskaden wider, in denen c-Jun vermindert exprimiert und phosphoryliert wird. Neurogenese, die an neuroprotektiven Effekten beteiligt sein könnte, konnte in der SN nicht gezeigt werden. Wohl aber birgt sie Potenzial für zelluläre Plastizität: durch äußere Stimuli konnte gliäre Proliferation induziert werden. Auch eine STN-Läsion wirkt sich auf gliäre Zellneubildung in der SN aus, allerdings nur transient. Diese Daten weisen auf die Bedeutung des Mikromilieus hin, das hochsensibel auf alle Ereignisse reagiert und diese mit beeinflusst.

Vermehrte Zellaktivität ohne gesteigertes Zellüberleben durch STN-Läsion

Der STN innerviert in erster Linie den GPi und die Substantia nigra, pars reticularis (SNr), glutamaterg. Mit dem dopaminproduzierenden Teil der Substantia nigra, der pars compacta (SNc), steht er ebenfalls in Verbindung, sowohl direkt über glutamaterge Efferenzen als auch indirekt über die SNr, die inhibierend auf die SNc wirkt. Aufgrund dieser komplexen Verbindungsstrukturen wirkt sich die in der Parkinsonkrankheit bestehende Überaktivität des STN auf verschiedenen Ebenen aus: es kommt zur Inhibition thalamokortikaler Projektionen durch Aktivierung der GABAergen SNr und GPi und damit zur typischen Parkinsonsymptomatik. Weiter hemmt die erregte SNr zusätzlich die dopaminerge Aktivierung in der SNc. Dies sind funktionelle Effekte, die die Imbalance der Neu-

rotransmitter reflektieren und grundsätzlich reversibel sind, wenn das Gleichgewicht wiederhergestellt wird. Erhöhte Glutamatlevel wirken aber nicht nur aktivierend, sondern ab einem gewissen Punkt auch zellschädigend. Solche exzitotoxischen Einflüsse gelten als beteiligt am irreversiblen Untergang dopaminerger Zellen (*Meldrum und Garthwaite, 1990; Greenberg, 1994; Rodriguez et al., 1998*). Folglich sollte sich eine Ausschaltung des STN auf die nigrale Degeneration möglicherweise neuroprotektiv auswirken. Frühere Studien (*Carvalho und Nikkah, 2001; Nakao et al., 1999; Piallat et al., 1996*), die dies in verschiedenen Parkinsoniermodellen untersuchten, konzentrierten sich auf die Darstellung TH exprimierender, also dopaminproduzierender und damit funktionell aktiver Neuronen. Es konnte gezeigt werden, dass eine vorhergehende Ausschaltung des STN mittels pharmakoinduzierter Ablation eine erhöhte Anzahl TH-positiver Neuronen bewirkt. Dies wurde als Neuroprotektion interpretiert, ohne jedoch zu berücksichtigen, dass TH lediglich einen Phänotyp und somit Zellaktivität ausdrückt. Aussagen über das eigentliche Zellüberleben können damit nur bedingt getroffen werden.

Wir untersuchten daher die Auswirkung einer STN-Läsion nicht nur auf die Expression von TH als nigralem Funktionsmarker, sondern markierten ebenso die nigrostriatalen Neuronen mit Fluorogold, das, zu Beginn der Studie ins Striatum injiziert und von den nigrostriatalen Neuronen retrograd axonal aufgenommen, als Indikator für Zellüberleben diente. Es zeigte sich, dass zwar die Zahl der funktionell aktiven Zellen (TH) in den ersten Wochen nach STN-Läsion erhöht war, die Zahl der überlebenden Zellen (FG) sich aber nicht signifikant von den schein- und nicht lädierten Tieren unterschied. Entsprechend diesem Ergebnis, das eine funktionelle Verbesserung vermuten ließ, stellten sich die Verhaltensuntersuchungen dar: Das amphetamininduzierte Rotationsverhalten, das bei einseitigem Basalganglienfunktionsverlust zu kontralateralen Rotationsbewegungen führt, war bei den STN-lädierten Tieren nach zwei und sechs Wochen signifikant abgeschwächt, die Funktion der lädierten Seite war also weniger stark eingeschränkt.

Aufhebung des Effekts im Langzeitexperiment

Wir weiteten im Folgenden den Untersuchungszeitraum von sechs auf zwölf Wochen aus, um Aussagen über Langzeitwirkungen machen zu können. Wie schon zuvor gab es keine Unterschiede in der Zahl fluorogoldmarkierter Neurone. Im Gegensatz zu den kürzeren Untersuchungszeiträumen war nach zwölf Wochen jedoch auch der Effekt des vermehrten TH-Phänotyps aufgehoben, d.h. die Zahl der aktiven dopaminergen Zellen war nach zwölf Wochen bei STN-lädierten und Kontrolltieren gleich. Dies drückte sich auch im motorischen Verhalten aus, bei dem es nun ebenfalls keine Unterschiede mehr gab.

Wir schließen daraus, dass es sich nicht um echte Neuroprotektion dergestalt handelt, dass Zellsterben verhindert wird. Vielmehr wird die Aktivität vorübergehend auf einem anderen Weg gesteigert. Charakteristisch für 6-OHDA-vermittelten Zelluntergang ist der frühzeitige Verlust des spezifischen Neurotransmitterphänotyps, teils lange vor dem eigentlichen Zelltod. So verharren einige Zellen nach Läsion in einem dysfunktionalen Zustand, bevor sie tatsächlich absterben (*Bowenkamp et al. 1996, Björklund et al., 1997*). Denkbar wäre, dass eine vorhergehende STN-Läsion eine vermehrte und verlängerte Aktivität dieser Zellen bewirkt, bevor der toxische 6-OHDA-Effekt auf Funktionalität und Zellleben gleichermaßen greift. Eine andere Möglichkeit ist, dass nicht die Zelldegeneration beeinflusst wird, sondern die verbesserte Funktion von neu gebildeten Neuronen ausgeht – eine STN-Läsion könnte in diesem Fall also ein Induktor für Neurogenese sein.

Verzögerte c-Jun-Expression und -Phosphorylierung nach STN-Läsion

Um weitere Informationen über die Art und den zeitlichen Verlauf der Zelldegeneration und eine etwaige Beeinflussung durch STN-Läsion zu erhalten, folgte die Analyse auf Ebene von beteiligten Transkriptionsfaktoren. Zellsterben wird über intrazelluläre Kaskaden vermittelt, in denen Transkriptionsfaktoren und verschiedene Botenstoffe beteiligt sind. Transkriptionsfaktoren der activator protein-1(AP-1)-Familie fungieren unter anderem in neurodegenerativen Kaskaden, die zum apoptotischen wie auch nicht-apoptotischen Zelltod führen können. Hierunter ist vor allem c-Jun gut untersucht, das

auch beim nigralen Zelltod beteiligt ist (*Estus et al., 1994; Ferrer et al., 1997*). Es gehört zu den „immediate-early genes“, die bei äußeren Stressoren wie Trauma, Ischämie oder toxischen Einflüssen innerhalb kurzer Zeit exprimiert werden. Durch Phosphorylierung wird c-Jun zusätzlich aktiviert (*Behrens et al., 1999; Herdegen et al., 1998; Hibi et al., 1993; Vaudano et al., 2001; Watson et al., 1998*). Hierfür sind spezifische Jun-N-terminale-Kinasen (JNKs), die zu den Mitogen-aktivierten Protein(MAP)-Kinasen gehören, verantwortlich. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Phosphorylierung die degenerative Wirkung c-Juns verstärkt (*Vaudano et al., 2001; Behrens et al., 1999; Martin-Villalba et al., 1999*), während eine verminderte Phosphorylierung Neurone vor Apoptose schützte (*Behrens et al., 1999*).

Im Falle der nigralen Zelldegeneration im 6-OHDA-Parkinsonmodell der Ratte wurde entsprechend eine vorhergehende c-Jun-Aktivierung und -phosphorylierung nachgewiesen (*Vaudano et al., 2001*). In unserer Studie wurde bereits drei Tage nach 6-OHDA-Läsion die maximale c-Jun-Expression erreicht, dabei war c-Jun in nahezu allen Zellen (99%) auch phosphoryliert, wie Doppelfärbungen zeigten. Dies spricht dafür, dass durch den toxischen 6-OHDA-Stimulus MAP-Kinase-Kaskaden aktiviert wurden, in denen c-Jun exprimiert und durch JNK phosphoryliert wurde. Hierauf kommt es unweigerlich zum Verlust der Zellfunktionen und zum Zelltod, wie die bereits besprochenen Daten belegen.

Bei STN-lädierten Tieren zeigten sich nach drei Tagen signifikant weniger c-Jun- und p-c-Jun-positive nigrale Neurone. Hier kam es erst nach zwei Wochen zum Maximum. Es ist also festzustellen, dass eine vorhergehende STN-Läsion eine Verzögerung der maximalen c-Jun-Expression und -Phosphorylierung bewirkt. Dieser Effekt kann durch die verminderte exzitotoxische Innervation durch den STN zu erklärt werden. Interessanterweise ist nach zwei Wochen außerdem ein verminderter Anteil c-Juns phosphoryliert (nämlich nur etwa zwei Drittel im Vergleich zu 99%). Dies ist ein Zeichen dafür, dass trotz der toxischen Einflüsse durch 6-OHDA (die c-Jun-Expression bewirken) die neurodegenerativen Kaskaden noch nicht voll aktiviert sind. Möglicherweise erklärt die verminderte Phosphorylierung den Erhalt dopaminerger Zellfunktion.

Zu späteren Zeitpunkten allerdings verlieren sich diese Effekte einer STN-Läsion.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Daten, die zeigten, dass übergeordnete Faktoren in neurodegenerativen Kaskaden – JNK2 u.a. – durch glutamaterge Exzitotoxizität, wie sie bei STN-Überaktivität auftritt, vermehrt exprimiert werden und durch NMDA-Blockade reduziert werden können (*Chen et al., 2003*). Der durch 6-OHDA retrograd vom Striatum aus vermittelte neurotoxische Effekt kann dadurch jedoch nur moduliert, nicht aber aufgehoben werden.

Neurogenese und zelluläre Plastizität in der SN

Da die STN-Läsion keinen Einfluss auf das Zellüberleben hatte, es aber trotzdem zu einer verbesserten dopaminergen Aktivität kam und auch klinisch eine anhaltende Besserung mit reduziertem L-Dopabedarf bei STN-Tiefenhirnstimulation zu sehen ist, stellte sich wie bereits angedeutet die Frage, ob hier neugebildete dopaminerge Neuronen eine Rolle spielen, es also möglicherweise zu Neurogenese kommen konnte. Dies würde sich wie in den beschriebenen Daten mit vermehrten TH-positiven Zellen ohne eine Zunahme an FG-markierten Neuronen darstellen.

Da die Substantia nigra hinsichtlich Neurogenese und zellulärer Plastizität nur unvollständig erforscht ist, untersuchten wir primär, ob solche hier generell möglich ist.

Als zentrale Orte neuronaler Neogenese gelten die Zona subgranularis des Gyrus dentatus sowie die Zona subventricularis der Seitenventrikel. Wahrscheinlich sind es Vorläuferzellen, die das gliale fibrilläre azidische Protein (GFAP) exprimieren - das typischerweise in Astrozyten gefunden wird -, die hier zu Neuronen differenzieren können. Auch aus anderen Gehirnregionen konnten multipotente Vorläuferzellen isoliert werden, die in vitro zu Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen ausdifferenzieren konnten. (*Palmer et al., 1999; Kondo & Raff, 2000*). Eine wesentliche Rolle spielt hierbei die Mikroumgebung, wobei die entscheidenden Faktoren, die eine Neuroneogenese ermöglichen, sowohl von zellulärer als auch von molekularer Seite, noch unbekannt sind. Von Bedeutung scheint darunter Dopamin zu sein. Bei Dopaminmangel ist in Tierexperimenten stark verminderte Zellneogenese in den neurogenen Zonen zu verzeichnen, während Dopaminrezeptorantagonisierung im Frontalhirn eine gesteigerte Neurogenese bewirkt (*Kippin et al., 2005*) Bei Parkinsonpatienten wurde eine

verringerte Neuroneogenese im Hippocampus und Bulbus olfactorius nachgewiesen (Höglinger et al., 2004). Diese Daten legen einen Zusammenhang zwischen Zelldegeneration, Dopaminmangel und Neurogenese auch in der Substantia nigra nahe.

Es konnte nachgewiesen werden, dass in der Substantia nigra konstant neue neuronale Zellen generiert werden, die gliale Marker exprimieren (in der Mehrheit das Chondroitinsulfat-Proteoglykan NG2) (Dawson et al., 2000; Lie et al., 2002). Ferner fanden sich neugebildete Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Inwieweit dies für dopaminerge Neuronen und einen möglichen Ersatz degenerierter Zellen gilt, bleibt strittig. Für die Substantia nigra konnte bislang keine Neuroneogenese gezeigt werden. Wohl aber wurde zelluläre Plastizität gesehen, auch konnten sich aus der SN in den DG transplantierte Zellen in vivo und in vitro zu Neuronen differenzieren (Lie et al., 2002).

Für andere neurogene Zonen, so für den DG, konnte gezeigt werden, dass äußere, physiologische Stimuli in Form eines „enriched environment“ und täglicher körperlicher Aktivität Neurogenese induzieren können (Van Praag et al., 1999; Kempermann et al., 1997; Steiner et al., 2004). Wir untersuchten, ob solche auch die zelluläre Plastizität in der SN beeinflussen, und ob es hierbei Unterschiede zwischen 6-OHDA-lädierten und gesunden Tieren gibt.

Keine nigrale Neurogenese, wohl aber gliale Proliferation durch physiologische Stimuli

Gemäß früher erhobenen Daten sahen auch wir in keiner der Gruppen neu gebildete neuronale Zellen. Dass aber nigrale Zellen in andere Hirnregionen transplantiert sehr wohl das Potenzial zur neuronalen Differenzierung besitzen, zeigt, welchen wichtigen Einfluss die Mikroumgebung auf Neuroneogenese hat. In der SN scheinen hierzu entscheidende Voraussetzungen nicht gegeben zu sein, jedoch ist zelluläre Plastizität auf Ebene der Gliazellen zu beobachten: Während eine 6-OHDA-Läsion die generelle Zellproliferation in der SN, die wir anhand BrdU-markierter Zellen detektierten, nicht beeinflusste, ergaben *enriched environment* und körperliche Aktivität sowohl in 6-OHDA-lädierten wie auch nativen Ratten eine signifikante Steigerung der Zellproliferation.

In der Analyse der Subgruppen der neu gebildeten Zellpopulation exprimierten die meisten Zellen NG2, das als oligodendrozytärer Vorläufermarker angesehen wird, für das es aber auch Hinweise zur neuronalen Differenzierung gibt (Aguirre et al., 2004; Belachew et al., 2003; Lie et al. 2002). Sowohl in gesunden als auch in 6-OHDA-lädierten Tieren war ein signifikanter Zuwachs an NG2-exprimierenden Zellen nach physiologischen Stimuli zu sehen. Dies war in der zweiten, kleineren Subpopulation, nämlich GFAP-exprimierenden Zellen, nur bei 6-OHDA-lädierten Tieren der Fall. GFAP gilt als Marker für nicht nur astrozytäre, sondern auch neuronale Vorläuferzellen. Nach 6-OHDA-Läsion wurden diese vermindert gebildet, die physiologischen Stimuli führten dabei wiederum zu einer Steigerung.

Dies gibt einen Hinweis darauf, dass physiologische Stimuli zelluläre Plastizität anstoßen können. Um dann aber weiter die Differenzierung zu Neuronen zu bewirken, reichen sie nicht aus, bzw. ist dies in den durch die SN gebotenen Gegebenheiten nicht möglich.

In den Verhaltensuntersuchungen, durch Rotationsverhalten getestet, verbesserte sich die Leistung bei lädierten Tieren während des Untersuchungszeitraums signifikant. Dies passt zu klinischen Daten, denen zufolge sich motorische und kognitive Funktionen bei Parkinsonpatienten nach äußeren Stimuli verbessern (Bilowit, 1956; Knott, 1957; Franklyn et al., 1981; Szekely et al., 1982; Hirsch, 2000; Toole et al., 2000).

Offensichtlich werden diese Veränderungen mehr durch Verschiebungen der Glia und des Mikromilieus bewirkt als durch eine tatsächliche Verbesserung neuronalen Überlebens oder gesteigerter Neurogenese. Von Bedeutung könnten hier die Astrozyten sein. Sie regulieren durch ihre Glutamattransporter extrazelluläre Glutamatlevel. Neuroprotektive Wirkungen durch Abfangen oxidativer Radikale und Abpufferung glutamaterger Exzitotoxizität wurden für Astrozyten postuliert (Hirsch & Bähr, 1999; Chen et al. 2004; Sortwell et al. 2000; Teismann et al., 2004). Da GFAP auch ein astrozytärer Marker ist, könnte die signifikante Steigerung GFAP-exprimierender Zellen in 6-OHDA-lädierten Tieren nach physiologischen Stimuli auch für astrozytäre Neurogenese stehen.

Transient gesteigerte Zellproliferation nach STN-Läsion

Bei den Faktoren, die zelluläre Plastizität beeinflussen, dürfen neben der lokalen Gliazellpopulation und äußeren Einflüssen auch die intrazerebralen interkommunikativen Einflüsse zwischen den verschiedenen Hirnregionen und Kerngebieten nicht außer Acht gelassen werden. Demzufolge galt es, die Auswirkungen des STN resp. seiner Ausschaltung auf das Proliferationsverhalten in der SN zu untersuchen.

Es kam zu einer transienten Zunahme proliferierender Zellen zwei Wochen nach STN-Läsion bei frühzeitiger BrdU-Applikation. Da sich dieser Effekt nach 8 Wochen nicht mehr darstellte, ist davon auszugehen, dass es sich eher um eine akute Begleitreaktion der Läsion handelt als um eine spezifische, langfristige Zellproliferation, wenn auch die Region nicht in direktem Kontakt zur Läsionsstelle steht. Die Untersuchung der Phänotypen ergab eine signifikante Erhöhung NG2-exprimierender Zellen und unveränderte mikrogläre Marker nach früher BrdU-Applikation. Diese Konstellation legt eine nicht immunologische, sondern anders geartete Reaktion nahe. NG2-exprimierende Zellen scheinen besonders sensibel auf äußere Ereignisse zu reagieren. Eine genauere Erforschung ihrer Funktion wird darüber weitere Aufschlüsse geben.

Bei späterer BrdU-Applikation und zu späteren Untersuchungszeitpunkten gab es keine Unterschiede zwischen Läsions- und Kontrollgruppe. Die Analyse des Phänotyps ergab einen Großteil nicht näher zuzuordnender Zellen, die genauer *in vitro* in Zellkulturen zu untersuchen bleiben. Es konnte folglich kein langfristiger Einfluss einer STN-Läsion auf zelluläre Plastizität und Zellneogenese in der gesunden SN festgestellt werden.

Aus den vorgestellten Studien lässt sich zusammenfassen, dass eine vorübergehende STN-Läsion die Abnahme TH-produzierender Zellen aufhält, ohne Einfluss auf die Zelldegeneration zu nehmen. Dies werteten wir als vorübergehende funktionelle Neuroprotektion, die auch in verbesserter Motorik zum Ausdruck kam. Es bleibt zu untersuchen, ob dieser Effekt tatsächlich einer quantitativ erhöhten dopaminergen Aktivität entspricht und wie sich eine solche verhält. Hierüber wird eine Untersuchung der TH-RNA Aufschluss geben.

Weiter bleibt offen, welche Faktoren genau eine solche funktionelle Verbesserung bewirken. Die Studien belegen, dass es nicht der verminderte Zelltod zustande bringt. Wohl aber ist eine Veränderung im degenerativen Programm beteiligt, wie die veränderte Expression und Phosphorylierung von c-Jun zeigt. Dies spricht dafür, dass Neurodegeneration nicht allein ein eindimensionales Zellsterben ist, sondern auf vielfältigen Ebenen abläuft und unterschiedliche Stadien durchwandert: es kommt zuerst zum Verlust der Zellfunktion, ohne dass die Zelle direkt stirbt. In diesem Stadium vermag die STN-Läsion einzugreifen, durch die das Transkriptionsprogramm verändert und die Zellfunktion länger aufrechterhalten wird. Daneben kommt es durch verschiedene äußere Einflüsse zu einer Veränderung des gliären Milieus, wie wir anhand physiologischer Stimuli zeigen konnten. Es konnte bislang keine nigrale Neurogenese in der Substantia nigra nachgewiesen werden, doch trotzdem verbesserte sich in 6-OHDA-lädierten Tieren das Rotationsverhalten. Dies ging einher mit einer verstärkten Zellproliferation, phänotypisch einer verstärkten Neubildung NG2- und GFAP-positiver Zellen. Das gibt Hinweis auf den wichtigen Einfluss der gliären Struktur. Inwiefern c-Jun an diesen Prozessen beteiligt ist, bleibt unklar. Bislang unbekannt ist seine Wirkung auf gliäre oder neuronale Proliferation; belegt ist aber die Bedeutung für neuronale Differenzierung (*Kanzawa et al., 2006; Eminel et al., 2007*), so dass auch ein genereller Einfluss auf die Zellneubildung vorstellbar ist.

Wie sich eine vorübergehende STN-Läsion auf die 6-OHDA-lädierte Substantia nigra in Form von Neurogenese auswirkt, müssen zukünftige Studien zeigen. Ebenso sollte die Rolle der Glia im Auge behalten werden. So ist auch die Bedeutung der Astrozyten weiter zu untersuchen, die neuroprotektiv durch eine Abpufferung der Exzitotoxizität wirksam sein können. Die Frage ist, ob deren Anzahl nach STN-Läsion gesteigert ist. Außerdem gilt es, die große Zahl nach STN-Läsion neugebildeter Zellen in Zellkulturen zu untersuchen, die bislang nicht näher identifiziert werden konnten.

REFERENZEN

- Aguirre AA, Chittajallu R, Belachew S, Gallo V. 2004. NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. *J. Cell Biol.* 165 (4), 575–589.
- Behrens A, Sibilina M, Wagner EF. 1999. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21:326–329.
- Belachew S, Chittajallu R, Aguirre AA, Yuan X, Kirby M, Anderson S, Gallo V. 2003. Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J. Cell Biol.* 161, 169–186.
- Bilowit DS. 1956. Establishing physical objectives in rehabilitation of patient's with Parkinson's disease (gymnasium activities). *Phys. Ther. Rev.* 36, 176–178.
- Bjorklund A, Rosenblad C, Winkler C, Kirik D. 1997. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 4, 186–200.
- Blandini F, Nappi G, Greenamyre JT. 2001. Subthalamic infusion of an NMDA antagonist prevents basal ganglia metabolic changes and nigral degeneration in a rodent model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 49:525–529.
- Bowenkamp KE, David D, Lapchak PL, Henry MA, Granholm AC, Hoffer BJ, Mahalik TJ. 1996. 6-hydroxydopamine induces the loss of the dopaminergic phenotype in substantia nigra neurons of the rat. A possible mechanism for restoration of the nigrostriatal circuit mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp. Brain Res.* 111, 1–7.
- Carvalho GA, Nikkhah G. 2001. Subthalamic nucleus lesions are neuroprotective against terminal 6-OHDA-induced striatal lesions and restore postural balancing reactions. *Exp Neurol* 171:405–417.
- Chen RW, Qin ZH, Ren M, Kanai H, Chalecka-Franaszek E, Leeds P, Chuang DM. 2003. Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. *J Neurochem* 84:566–575.
- Chen Y, Vartiainen NE, Ying W, Chan PH, Koistinaho J, Swanson RA. 2004. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *J Neurochem* 77:1601–1610
- Dawson MR, Lewine JM, Reynolds R. 2000. NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J. Neurosci. Res.* 61, 471–479.
- Eminel S, Roemer L, Waetzig V, Herdegen T. 2008. C-Jun N-terminal kinases trigger both degeneration and neurite outgrowth in primary hippocampal and cortical neurons. *J. Neurochem.* 104, 957–969
- Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM Jr. 1994. Altered gene expression in neurones during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J. Cell Biol* 127:1717–1727.
- Ferrer I, Planas AM, Pozas E. 1997. Radiation-induced apoptosis in developing rats and kainic acid-induced excitotoxicity in adult rats are associated with distinctive morphological and biochemical c-Jun/AP-1 (N) expression. *Neuroscience* 80:449–458.
- Franklyn S, Kohout LJ, Stern GM, Dunning M. 1981. Physiotherapy in Parkinson's disease. In: Rose, F.C., Capileto, R. (Eds.), *Research Progress in Parkinson's Disease*. Pittman Medical Ltd, Tunbridge Wells, pp. 397–400.
- Greenberg DA. 1994. Glutamate and Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 35, 639.
- Herdegen T, Claret FX, Kallunki T, Martin-Villalba A, Winter C, Hunter T, Karin M. 1998. Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* 18:5124–5135.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7:2135–2148.
- Hilker R, Portman AT, Voges J, Staal MJ, Burghaus L, van Laar T, Koulousakis A, Maguire RP, Pruim J, de Jong BM, Herholz K, Sturm V, Heiss WD, Leenders KL. 2005. Disease progression

- continues in patients with advanced Parkinson's disease and effective subthalamic nucleus stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 76(9): 1186-7.
- Hirsch EC. 2000. Nigrostriatal system plasticity in Parkinson's disease: effect of DAergic denervation and treatment. *Ann. Neurol*. 47, 115–120.
- Hirsch S, Bähr M. 1999. Immunocytochemical characterization of reactive optic nerve astrocytes and meningeal cells. *Glia*.26(1):36-46
- Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci*. 7 (7), 726–735.
- Kanzawa T, Iwado E, Aoki H, Iwamaru A, Hollingsworth EF, Sawaya R, Kondo S, Kondo Y. 2006. Ionizing radiation induces apoptosis and inhibits neuronal differentiation in rat neural stem cells via the c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway. *Oncogene*. 25(26):3638-48.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386 (6624), 493–495.
- Kippin TE, Kapur S, van der Kooy D. 2005. Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *J. Neurosci*. 25 (24), 5851–58223.
- Knott M. 1957. Report of case of parkinsonism treated with proprioceptive facilitation techniques. *Phys. Ther. Rev*. 37, 229.
- Kondo T, Raff M. 2000. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289 (5485), 1754–1757.
- Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, Ardouin C, Koudsie A, Limousin PD, Benazzouz A, LeBas JF, Benabid AL, Pollak P. 2003. Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 349(20):1925-34.
- Lie DC, Dziewczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH. 2002. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J. Neurosci*. 22 (15), 6639–6649.
- Martin-Villalba AM, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt RM, Vogel J, Schenkel J, Herdegen T, Debatin KM. 1999. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurones. *J Neurosci* 19:3809–3817.
- Meldrum B, Garthwaite J. 1990. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci*. 11, 379– 387.
- Nakao N, Nakai E, Nakai K, Itakura T. 1999. Ablation of the subthalamic nucleus supports the survival of nigral dopaminergic neurons after nigrostriatal lesions induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Ann Neurol* 45:640–651.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. 1999. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci*. 19 (19), 8487–8497.
- Piallat B, Benazzouz A, Benabid AL. 1996. Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *Eur J Neurosci* 8:1408–1414.
- Rodriguez MC, Obeso JA, Olanow CW. 1998. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol* 44:175–188.
- Rodriguez-Oroz MC, Obeso JA, Lang AE, Houeto JL, Pollak P, Rehnrcrona S, Kulisevsky J, Albanese A, Volkmann J, Hariz MI, Quinn NP, Speelman JD, Guridi J, Zamarbide I, Gironell A, Molet J, Pascual-Sedano B, Pidoux B, Bonnet AM, Agid Y, Xie J, Benabid AL, Lozano AM, Saint-Cyr J, Romito L, Contarino MF, Scerrati M, Fraix V, Van Blercom N. 2005. Bilateral deep brain stimulation in Parkinson's disease: a multicentre study with 4 years follow-up. *Brain*. 128(Pt 10):2240-9.
- Sortwell CE, Daley BF, Pitzer MR, McGuire SO, Sladek JR, Collier TJ. 2000. Oligodendrocyte-type 2 astrocyte-derived trophic factors increase survival of developing dopamine neurons through the inhibition of apoptotic cell death. *J Comp Neurol* 426:143–153

- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. 2004. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46 (1), 41–52.
- Szekely AM, Barbaccia ML, Alho H, Costa E. 1989. In primary cultures of cerebellar granule cells the activation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors induces c-fos mRNA expression. *Mol Pharmacol* 35:401–408.
- Peter Teismann . Jörg B. Schulz. 2004. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res* 318: 149–161
- Toole T, Hirsch MA, Forkink A, Lehmann DA, Maitland CG. 2000. The effects of balance and strength training program on equilibrium in Parkinsonism: a preliminary study. *Neurorehabilitation* 14, 165–174.
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2 (3), 266–270.
- Vaudano E, Rosenblad C, Bjorklund A. 2001. Injury induced c-Jun expression and phosphorylation in the dopaminergic nigral neurons of the rat: correlation with neuronal death and modulation by glialcell-line-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 13:1–14
- Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis J, Rubin LL, Ham J. 1998. Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 18:751–762.

PUBLIKATIONSLISTE

1. *Ablation of the subthalamic nucleus protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of Parkinson's disease.*

Paul G, Meissner W, Rein S, Harnack D, Winter C, **Hosmann K**, Morgenstern R, Kupsch A. 2004 Exp Neurol. 185 (2): 272-80.

Impact factor 3,369

2. *Subthalamic nucleus lesioning inhibits expression and phosphorylation of c-Jun in nigral neurons in the rat's 6-OHDA model of Parkinson's disease.*

Winter C*, **Hosmann K***, Harnack D, Meissner W, Paul G, Morgenstern R, Kupsch A. 2006 Synapse. 60 (1): 69-80.

Impact factor 2,87

3. *Enriched environment induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behaviour function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease.*

Steiner B, Winter C, **Hosmann K**, Siebert E, Kempermann G, Petrus DS, Kupsch A. 2006 Exp Neurol. 199 (2): 291-300.

Impact factor 4,156

4. *Unilateral lesion of the subthalamic nucleus transiently provokes bilateral subacute glial cell proliferation in the adult rat substantia nigra.*

Steiner B, Kupsch A, Siebert E, **Hosmann K**, Klempin F, Morgenstern R, Winter C. 2008 Neurosci Lett. 430 (2): 103-8.

Impact factor 2,085

* Beide Autoren trugen zu gleichen Teilen als Erstautoren zu der Studie bei.

ERKLÄRUNG ÜBER DEN ANTEIL AN DEN PUBLIKATIONEN

Der Promovend hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1 *Paul G, Meissner W, Rein S, Harnack D, Winter C, **Hosmann K**, Morgenstern R, Kupsch A. 2004 Exp Neurol. 185 (2): 272-80. Ablation of the subthalamic nucleus protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of Parkinson's disease.*

20 Prozent

- Beteiligung an mikroskopischer und statistischer Auswertung
- Beteiligung an Manuskripterstellung

Publikation 2 *Winter C*, **Hosmann K***, Harnack D, Meissner W, Paul G, Morgenstern R, Kupsch A. 2006 Synapse. 60 (1): 69-80. Subthalamic nucleus lesioning inhibits expression and phosphorylation of c-Jun in nigral neurons in the rat's 6-OHDA model of Parkinson's disease.*

75 Prozent

- Planung und Studiendesign in Zusammenarbeit mit C. Winter und A. Kupsch
- Stereotaktische Operationen und Verhaltensversuche
- histologische Aufarbeitung sowie mikroskopische und statistische Auswertung
- Erstellung des Manuskriptes in Zusammenarbeit mit C. Winter

Publikation 3 *Steiner B, Winter C, **Hosmann K**, Siebert E, Kempermann G, Petrus DS, Kupsch A. 2006 Exp Neurol. 199 (2): 291-300. Enriched environment induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behaviour function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease.*

30 Prozent

- Stereotaktische Operationen und Verhaltensversuche
- Beteiligung an histologischer Aufarbeitung sowie mikroskopischer und statistischer Auswertung
- Beteiligung an Manuskripterstellung

Publikation 4 *Steiner B, Kupsch A, Siebert E, **Hosmann K**, Klempin F, Morgenstern R, Winter C. 2008 Neurosci Lett. 430 (2): 103-8. Unilateral lesion of the subthalamic nucleus transiently provokes bilateral subacute glial cell proliferation in the adult rat substantia nigra.*

20 Prozent

- Stereotaktische Operationen und Verhaltensversuche
- Beteiligung an histologischer Aufarbeitung sowie mikroskopischer und statistischer Auswertung
- Beteiligung an Manuskripterstellung

Berlin, 12.10.2008

* Beide Autoren trugen zu gleichen Teilen als Erstautoren zu der Studie bei.

LEBENS LAUF

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

ERKLÄRUNG ÜBER DIE SELBSTSTÄNDIGKEIT

Ich, Kai Hosmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Neuroprotektion und Neurogenese im 6-OHDA-Parkinson-Modell der Ratte nach therapeutischer Intervention“ 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.

Berlin, 12.10.2008

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Dr. Christine Winter für ihre engagierte Betreuung, mit der sie mir stets motivierend und unterstützend zur Seite gestanden hat.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Rudolf Morgenstern und Prof. Andreas Kupsch bedanken, in deren Arbeitsgruppen ich viele Impulse sammeln durfte und mich immer gut aufgehoben gefühlt habe.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich genauso bei Renate Winter und Christiane Kölske für ihre zuverlässige und freundliche Mitarbeit.

Zum Schluss geht mein herzlicher Dank an meine Eltern, die mich immer mit großem Vertrauen unterstützt haben.