

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

DISSERTATION

Zelluläre Plastizität der Substantia nigra im MPTP-
Parkinsonmodell der Maus: Die Wirkung physiologischer Stimuli
in Abhängigkeit von Dopamin

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Klaißle
aus Schwäbisch Hall

Datum der Promotion: 14.02.2014

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt/ Abstract	09
2. Einleitung	12
2.1 Morbus Parkinson	12
2.1.1 Geschichte, Epidemiologie, Klinik	12
2.1.2 Pathogenese	13
2.1.3 Therapie	14
2.2 Tiermodelle für Morbus Parkinson	17
2.2.1 6-OHDA	17
2.2.2 Rotenon	18
2.2.3 Paraquat	18
2.2.4 MPTP	18
2.3 Zelluläre Plastizität im ZNS	21
2.3.1 Definition	21
2.3.2 Stammzellen, Progenitoren, Präkursoren	21
2.3.3 Neurogenese	22
2.3.4 Gliogenese	24
2.3.5 Regulation der zellulären Plastizität	26
2.3.5.1 Mikromilieu	26
2.3.5.2 Dopaminerge Beeinflussung zellulärer Plastizität	26
2.3.5.3 Physiologische Stimuli	27
2.3.6 Zelluläre Plastizität der Substantia nigra	28
2.4 Fragestellung	30
3. Methoden	31
3.1 Experimentelles Design	31
3.2 Versuchstiere	33
3.3 Zeitlicher Ablauf	34
3.4 Haltungsbedingungen	34
3.4.1 Haltung unter Standardbedingungen	35
3.4.2 Haltung in Laufradkäfigen	35
3.4.3 Haltung in reizreicher Umgebung	36
3.5 Das MPTP- Parkinsonmodell der Maus	37
3.5.1 Injektionsschema	37
3.5.2 Sicherheitsmaßnahmen	37

3.6 BrdU- Applikation	38
3.7 Medikamentöse Behandlung mit L- Dopa und Benserazid	38
3.8 Transkardiale Perfusion	39
3.9 Fixierung, Verarbeitung und Aufbewahrung	39
3.10 Gefriermikrotom	39
3.11 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	40
3.11.1 Immunhistochemie	40
3.11.1.1 BrdU- Färbung	40
3.11.1.2 Tyrosinhydroxylase (TH)- Färbung	41
3.11.2 Immunfluoreszenz	41
3.12 Puffer und Lösungen	43
3.13.1 Lichtmikroskopie	44
3.13.2 Konfokale Mikroskopie	44
3.14 Statistische Analyse der Daten aus Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	45
3.15 Zellkultur	47
4. Ergebnisse	50
4.1 TH- positive Zellen	50
4.1.1 Einfluss des Parkinsonmodells auf TH- positive Zellen	50
4.1.2 Einfluss von L- Dopa und physiologischen Stimuli auf TH- positive Zellen	51
4.2 BrdU- positive Zellen	52
4.2.1 Einfluss von MPTP auf BrdU- positive Zellen	52
4.2.2 Einfluss von L- Dopa auf BrdU- positive Zellen	54
4.3 Typisierung proliferierter Zellen	55
4.3.1 Keine Neurogenese in der SN	55
4.3.2.1 Reaktive mikrogliale Proliferation in der SN in Folge von MPTP	57
4.3.2.2 L- Dopa hat keinen Einfluss auf nigrale mikrogliale Proliferation	58
4.3.3.1 Die Zahl NG2-positiver oligodendrozytärer Vorläuferzellen nimmt über die Zeit ab	59
4.3.3.2 Oligodendrozytäre Präkursoren (OPCs) sind suszeptibel für L-Dopa bei vorheriger Dopamindepletion	60
4.3.4.1 Oligodendrogenese in der adulten SN wird durch MPTP inhibiert	61
4.3.4.2 Inhibierte Oligodendrogenese in der adulten SN durch MPTP wird durch L-Dopa nicht beeinflusst	63
4.3.5.1 Nestin-positive neurale Vorläufer werden nur vorübergehend von MPTP beeinflusst	64
4.3.5.2 Nestin- positive Zellen werden nicht von L- Dopa beeinflusst	66
4.3.6 Ein Teil der proliferierte Zellen der SN ist nicht immunotypisierbar	66

4.3.7.1 Physiologische Stimuli- Laufradaktivität	67
4.3.7.2 Physiologische Stimuli fördern die nigrale proliferative Plastizität gesunder Mäuse. Bei MPTP- behandelten Mäusen zeigt sich kein Effekt auf die Proliferation	68
4.3.7.3 L-Dopa re-induziert die nigrale zelluläre Proliferation von MPTP- Mäusen	70
4.3.8.1 Physiologische Stimuli beeinflussen spezifisch die Proliferation NG2-positiver Zellen in gesunder SN	72
4.3.8.2 Physiologische Stimuli wirken in MPTP- Mäusen proliferativ auf NG2- positive Zellen, in Abhängigkeit von L-Dopa	74
4.3.9 Physiologische Stimuli haben keinen Einfluss auf die Bildung reifer Oligodendrozyten	75
4.3.10 Physiologische Stimuli haben keinen Einfluss auf Proliferation und Überleben Nestin- und Iba1- positiver Zellen	76
4.4 In Zellkultur lässt sich kein neurogenes Potential Nestin- positiver Zellen in der SN nachweisen	77
5. Diskussion	79
5.1 Methodenkritik	79
5.1.1 Tierhaltung und physiologische Stimuli	79
5.1.2 Laufradaktivität	80
5.1.3 Das MPTP-Parkinsonmodell der Maus	80
5.1.4 BrdU und die Detektion proliferierender Zellen	81
5.1.5 Phänotypische Klassifikation der proliferierten Zellen	82
5.1.6 Lokalisation der markierten Zellen in der SNpc und SNpr	83
5.1.7 Auswirkung von MPTP auf die physische Aktivität	83
5.2 Interpretationen der Ergebnisse	85
5.2.1 Dopaminerge Neurone	85
5.2.1.1 Reduktion dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) durch MPTP	85
5.2.1.2 Keine Beeinflussung von dopaminergen Neuronen durch Levodopa und physiologische Stimuli	86
5.2.2 Zellproliferation in der Substantia nigra	88
5.2.2.1 Effekte von MPTP und L-Dopa auf die Zellproliferation	88
5.2.2.2 Physiologische Stimuli	89
5.2.2.3 Physiologische Stimuli, MPTP und L- Dopa	90
5.2.2.4 Proliferierte Zellpopulationen	91
5.2.2.5 Passagere mikrogliale Proliferation	91
5.2.2.6 Einfluss der Stimuli auf NG2-Zellen und Oligodendrogenese	92
5.2.2.7 Proliferation neuraler Vorläuferzellen	94
5.2.2.8 Zu keinem Zeitpunkt Neurogenese detektierbar	95

5.3 Klinische Relevanz	96
5.4 Zusammengefasste Ergebnisbeurteilung	98
6. Literaturverzeichnis	99
7. Eidesstattliche Versicherung	114
8. Lebenslauf	115
9. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen	116
10. Danksagung	117

Abkürzungsverzeichnis

+	positiv
3V	dritter Ventrikel
4V	vierter Ventrikel
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
95%KI	95% Konfidenzintervalle
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
Aq	Ductus aquaticus, Aquädukt
BDNF	Brain- derived neurotrophic factor
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin
CNPase	2',3'zyklische-Nukleotid-3'phosphodiesterase
C57BL/6	C57 black 6, Mausstamm
Cy5	Indodicarbocyanin 5
DAB	3,3 Diaminobenzidindihydrochlorid
DAT	Dopamintransporter
DCX	Doublecortin
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ENR	Enriched environment, reizreiche Umgebung des Käfigs als physiologischer Stimulus
EGF	Epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
FGF-2	Fibroblast growth factor- 2, Fibroblastenwachstumsfaktor- 2
FITC	Fluorescein- isothiocyanat
GFAP	Glial fibrillary acidic protein, saures Gliafaserprotein
GFP	Green fluorescent protein, grünes fluoreszierendes Protein
Iba1	Ionisiertes Calcium bindendes Adaptormolekül 1
i.p.	Intraperitoneal
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
i.v.	Intravenös
KG	Körpergewicht
LDA	Limiting Dilution Analysis, Grenzwertverdünnung
L-Dopa	Levodopa, L-3,4-Dihydroxyphenylalanin

M	Molar
MPPP	1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxy-piperidin
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid, hier gleichzusetzen mit 0,9% NaCl- Lösung
NG2	neural/ glial antigen 2, Neurales/Gliales Antigen 2
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSC	Neural stem cell , neurale Stammzelle
OPC	Oligodendrocyte progenitor cell, oligodendrozytäre Vorläuferzelle
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatpufferlösung
PBS +	Phosphatpufferlösung mit Triton und Serum
PFA	Paraformaldehyd
PS	Parkinsonsyndrom
PVR	Periventrikuläre Region
RRX	Rhodamin Red X
RUN	Running, Mäuse in Käfig mit Laufrad als physiologischer Stimulus
S100β	S100 Calcium bindendes Protein β
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler des Mittelwerts
SGZ	subgranuläre Zone des Gyrus dentatus
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNpr	Substantia nigra pars reticulata
S- Phase	Synthesephase
STAN	Standardhaltungsbedingungen ohne physiologische Stimuli
SVZ	Subventrikuläre Zone
TBS	Tris buffered saline, Tris Pufferlösung
TH	Tyrosinhydroxylase
THS	Tiefe Hirnstimulation
UPDRS	Unified parkinson's disease rating scale, vereinheitlichte Bewertungsskala für Morbus Parkinson
VTA	Ventral tegmental area, Area tegmentalis ventralis
vWF	Van Willebrand Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Abstrakt

Einleitung

Bei Morbus Parkinson kommt es zur Degeneration dopaminerges Neurone in der Substantia nigra (SN) und in Folge zu einem Dopaminmangel. Die Versuche, die dopaminergen Neurone durch adulte Neurogenese zu regenerieren sind bisher gescheitert. Aber es zeigte sich, dass ein kontinuierlicher nigraler Zellumsatz stattfindet. Bei den nigral proliferierenden Zellen handelt es sich oftmals um oligodendrozytäre Vorläuferzellen, die das neurale/gliale Antigen 2 (NG2) exprimieren und die in vitro neurogenes Potential haben sollen. Über ihre funktionelle Bedeutung in der SN und ihre Beeinflussbarkeit durch regulatorische Faktoren, die auf Zellproliferation und –differenzierung wirken, besteht noch Unklarheit. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Faktoren Dopamin und physiologischer Stimulation auf die adulte Substantia nigra und deren zelluläre Plastizität zu untersuchen. Es galt, proliferierende Zellpopulationen zu charakterisieren und Differenzierungsvorgänge zu erfassen. Besondere Aufmerksamkeit lag auf der Analyse der Proliferation und Differenzierung von NG2-Zellen und der Detektion neuronaler Vorläuferzellen.

Methoden

An transgenen Nestin- GFP exprimierenden Mäusen wurde in dieser Arbeit das 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)- Modell für Morbus Parkinson angewandt, um Proliferationsvorgänge in der SN zu detektieren und ihre Beeinflussung bei Dopamindepletion durch MPTP zu erkennen.

In unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden die in der SN proliferierten Zellen zu vier Zeitpunkten nach MPTP- Gabe quantifiziert und charakterisiert.

Die Einflüsse von reizreicher Umgebung und freiwilliger physischer Aktivität, im Sinne physiologischer Stimuli, auf Zellproliferation und –differenzierung, wurden detektiert, ebenso wie der Effekt von Dopaminsubstitution durch Gabe von L-Dopa + Benserazid. Das neurogene Potential der SN wurde in vitro untersucht.

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass die Zahl NG-2 positiver Zellen, die nigrale Gesamtzellproliferation und das Zellüberleben durch physiologische Stimuli in gesunden Versuchsgruppen gesteigert werden. Bei Dopamindepletion durch MPTP hingegen nicht. Die Substitution von Dopamin ermöglichte die Wiederherstellung des Effekts physiologischer Stimuli auf die nigrale zelluläre Plastizität. Die Untersuchung des neurogenen Potentials in vitro

ergab vereinzelte Nestin- GFP- positive Neurosphären, die jedoch nicht weiter expandierbar und differenzierbar waren.

Schlussfolgerung

Physiologische Stimuli wirken in der SN auf die zelluläre Plastizität, genauer auf NG2-positive Zellen, in Abhängigkeit von Dopamin proliferationsfördernd. Dies könnte einen wichtigen Mechanismus zur Neuroprotektion und –regeneration bei Morbus Parkinson darstellen. Neurogenes Potential der SN in vitro konnte nicht nachgewiesen werden.

Diese Arbeit konnte wichtige Hinweise für das Verständnis der Regulation der nigralen Zellproliferation und –differenzierung liefern. Dass die Wirksamkeit physiologischer Stimuli auf die nigrale zelluläre Plastizität in der Maus von Dopamin abhängt, konnte hier erstmals gezeigt werden.

Abstract

Introduction

The degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) and a depletion of dopamine are a hallmark Parkinson's disease. So far the attempts to regenerate dopaminergic neurons by adult neurogenesis were unsuccessful. But a continuous turnover of nigral cells has been observed in the SN. Often these cells are oligodendrocyte precursor cells, characterized by expression of the neural/glial antigen-2 (NG2). These cells have shown neurogenic potential in vitro. Little is known about their role in the SN and their reaction to regulatory factors that may influence cell proliferation and cell differentiation in the central nervous system. The objective of this study was to examine the effect of dopamine and physiological stimulation on the adult SN and its cellular plasticity. We focused particularly on the proliferation and differentiation of NG2 cells and the detection of neuronal precursors.

Methods

Transgenic Nestin-GFP expressing mice were used for the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)- model for Parkinson's disease to examine the impact of dopamine depletion caused by MPTP on proliferational processes in the SN. Newborn nigral cell in various experimental groups were quantified and characterized at four different time points after application of MPTP. The influence of environmental

enrichment and voluntary physical activity acting as physiological stimulation on cell proliferation and differentiation were examined, as well as the effect of dopamine substitution by treatment with levodopa and benserazide. The neurogenic potential of the SN was examined in vitro.

Results

An increase in the numbers of NG2-positive cells and in overall nigral cell proliferation and survival induced by physiological stimulation in healthy experimental groups but not after dopamine depletion was observed. Levodopa treatment restored the effect of physiological stimulation on nigral cellular plasticity.

In vitro experiments showed sporadic Nestin-GFP-positive neurospheres but numbers were too low for long-term culture and further characterization.

Conclusion

Physiological stimulation induces nigral cellular plasticity, specifically generation of NG2-positive cells, in a dopamine-dependent manner. This may be a potentially relevant mechanism for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease. Neurogenic potential in the SN could not be demonstrated.

The results of this study promoted further understanding of regulatory mechanisms in nigral cell proliferation and differentiation. It was shown for the first time that the effect of physiological stimulation on nigral cellular plasticity in mice depends on dopamine.

2. Einleitung

2.1 Morbus Parkinson

2.1.1 Geschichte, Epidemiologie, Klinik

Im Jahre 1817 beschrieb James Parkinson (1755- 1824) sechs klinische Fälle einer Erkrankung, die er „Paralysis agitans“, oder „Schüttellähmung“ nannte (Lees, 2007). Es handele sich um eine langsam progrediente Erkrankung mit „unwillkürlicher zitternder Bewegung, verminderter Muskelkraft [...] der Neigung den Rumpf vornüber zu beugen und vom Gehen ins Laufen zu fallen“ (Parkinson, 1817). Jean Marie Charcot führte 1877 den noch heute verwendeten Begriff „Morbus Parkinson“ für diese häufige, chronisch- degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) ein (Lees, 2007).

Es ist begrifflich zu differenzieren zwischen dem nosologischen Terminus „Parkinsonsyndrom“ (PS), und den unterschiedlichen Ätiologien, die dem PS zugrunde liegen können (Leitlinien DGN, Eggert et al., 2012). Dabei wird zwischen dem idiopathischen Parkinsonsyndrom (IPS) (Synonym: Morbus Parkinson), welches etwa 75% der PS ausmacht, sowie familiären Formen, sekundären Formen und PS im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen, unterschieden (Eggert et al., 2012). In Deutschland liegt die Prävalenz des IPS bei 100- 200 pro 100.000 Einwohnern. Es handelt sich damit um die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach Morbus Alzheimer. Mit steigendem Alter nimmt die Prävalenz zu und liegt bei über 65- jährigen bei 1.800/ 100.000 (Diener et al., 2008). Aufgrund des demographischen Wandels hin zu einer älteren Bevölkerung, ist in Deutschland in Zukunft mit einem weiteren Anstieg der Prävalenz zu rechnen.

Klinisch wird das IPS definiert als Vorhandensein von Akinesie und einem der weiteren Kardinalsymptome Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität. Zudem können fakultative Begleitsymptome auftreten. Hierzu gehören sensorische Symptome (Dysästhesie, Schmerzen), vegetative Symptome (Riechstörungen, Störungen von Blutdruck, Temperaturregulation, Harnblasenfunktion, sexueller Funktion), psychiatrische Symptome (Depression, Angststörungen) und kognitive Symptome (Demenz) (Aarsland et al., 1999, Diener et al., 2008, Eggert et al., 2012). Die klinische Stadieneinteilung erfolgt nach der fünfstufigen Skala von Hoehn und Yahr, wobei der Schweregrad der körperlichen Beeinträchtigung beurteilt wird, oder nach der

vereinheitlichten Bewertungsskala für Morbus Parkinson (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS), die anhand eines Punktesystems neben dem Schweregrad auch Motorik, Aktivität, Stimmung und Behandlungskomplikationen berücksichtigt (Diener et al., 2008, Eggert et al., 2012).

2.1.2 Pathogenese

Die Ursache des IPS ist bis heute nicht geklärt. Jedoch bestehen PS mit bekannter Ätiologie, wie die bereits erwähnten symptomatischen oder sekundären Formen, bspw. nach Infarkten und raumfordernden Prozessen (Blutungen, Tumoren), nach Traumata, Entzündungen oder Intoxikationen, oder im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen (atypische PS) wie Multisystematrophien, Lewy-Körperchen Demenz oder progressiver supranukleärer Blickparese (PSP) (Diener et al., 2008). Des Weiteren existieren familiäre und seltene monogenetische Formen des PS, z.B. Defekte im α -Synuclein kodierenden Gen (=Park 1/Park 4) und unterschiedlichen Parkin-Genen (für Übersicht zur Genetik, siehe Farrer, 2006).

Den idiopathischen Formen (IPS) liegt am ehesten eine multifaktorielle Genese zugrunde, bedingt durch das Zusammenspiel von polygenetischen Faktoren, Umwelteinflüssen und Gen- Umwelt Interaktionen (zur Übersicht, siehe Bekris 2010).

Neuropathologisch ist die Erkrankung durch einen Verlust dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SnpC) des Mittelhirns gekennzeichnet. Es werden eine Reihe von Faktoren, wie oxidativer Stress, Neuroinflammation, proteosomale und mitochondriale Dysfunktion diskutiert, die die apoptotischen Kaskaden der Zellen in Gang setzen und letztlich den Zelltod bedingen (Przedborski, 2005).

Dieser Zelluntergang führt zu einem Verlust des Neurotransmitters Dopamin im Striatum, wohin die nigralen dopaminergen Neurone projizieren (Freundlieb et al., 2006). Daneben bestehen aber noch zahlreiche weitere Efferenzen, beispielsweise in den Thalamus, den Kortex und die subventrikulären Zonen der Seitenventrikel, sowie die direkt angrenzende Substantia nigra pars reticulata (SNpr) (Carpenter et al., 1976, Fuxe et al., 2006, Freundlieb et al., 2006, Zhou und Lee, 2011). Klinisch manifest wird die Krankheit bei einem Verlust von ca. 60% der nigralen dopaminergen Neurone oder einem Absinken des striatalen Dopamingehalts um 70- 80% (Bernheimer et al., 1973; Fearnley und Lees, 1991). Dopaminerge Areale außerhalb der SN sind vom Zellverlust weitgehend unberührt (Hirsch et al., 1988, Uhl et al., 1985).

Andere neuronale Systeme, wie das Noradrenerge (Locus coeruleus), Serotonerge (Raphe Kerne), Cholinerge (Nucleus basalis Meynert u.A.) und Peptiderge sind hingegen betroffen, obgleich weniger stark als das dopaminerge System (Jellinger, 1991). Die Beeinflussung unterschiedlicher neuronaler Systeme in zahlreichen Hirnregionen kann als Korrelat dafür gewertet werden, dass über die motorischen Kardinalsymptome hinausgehend kognitive, psychische und vegetative Beschwerden auftreten können. In den Hirnarealen, die neurodegenerativ betroffen sind, zeigen sich sogenannte Lewy- Körperchen. Diese sind runde, zytoplasmatische, eosinophile Einschlusskörperchen in den Neuronen (Jellinger, 2009). Sie bestehen unter anderem aus α -Synuclein, Ubiquitin und Neurofilament. Sie sind jedoch nicht spezifisch für Morbus Parkinson und können auch bei klinisch unauffälligen Personen auftreten (Jellinger, 2009).

2.1.3 Therapie

Medikamentöse Therapie

Da kausale, restaurative Therapien des IPS bislang nicht bekannt sind, ist die Behandlung derzeit symptomatisch (Eggert et al., 2012, Siebert, 2008). Der striatale Dopaminmangel soll dabei pharmakotherapeutisch ausgeglichen werden. Peripher appliziertes Dopamin kann die Blut- Hirn- Schranke nicht überwinden. Daher wird dessen Vorstufe L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L- Dopa), das die Blut- Hirn- Schranke passieren kann, in fester Kombination mit einem Decarboxylaseinhibitor gegeben. So wird eine Decarboxylierung des Pro- Pharmakons L- Dopa zu Dopamin außerhalb des ZNS verhindert und die Wirkung von Dopamin entfaltet sich nur im ZNS. L- Dopa ist als Monotherapie anderen Parkinsonmedikamenten in seiner symptomatischen Wirkung überlegen (Levine et al., 2003, Eggert et al., 2012), verzögert jedoch nicht die Progression der Krankheit und kann zu Therapiekomplicationen, wie einem Wirkungsverlust bei langer Therapiedauer, Dyskinesien und psychiatrische Nebenwirkungen, wie beispielsweise Halluzinationen führen (Diener et al., 2008). Dopaminagonisten, von denen derzeit 10 Wirkstoffe in Deutschland zugelassen sind, entfalten, wie Dopamin, ihre Wirkung an Dopaminrezeptoren und sind in der Parkinsontherapie wirksam (Adler et al., 1997, Eggert et al., 2012). Sie wirken zwar weniger stark als L-Dopa, führen aber seltener und später zu Dyskinesien als die L-Dopa- Monotherapie (Oertel et al., 2006). Weitere medikamentöse Therapieoptionen sind Monoaminoxidase B (MAO-B) - und Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) -

Inhibitoren, die den enzymatischen Abbau von Dopamin hemmen. Während COMT-Inhibitoren nur in Kombination mit L- Dopa verwendet werden, sind MAO-B Inhibitoren auch monotherapeutisch wirksam (Ives et al., 2004). Bei akinetischen Krisen und bei L- Dopa assoziierten Dyskinesien hat sich Amantadin als NMDA- Antagonist bewährt (Crosby et al., 2003, Eggert et al., 2012). Die Wirkung beruht auf der Hemmung der kortikostriatalen glutamergen Projektionen.

Die Gruppe der Anticholinergika findet vor allem bei vorherrschendem Ruhetremor Anwendung. Die Studienlage ist jedoch mangels guter kontrollierter Studien nicht ausreichend und periphere anticholinerge Nebenwirkungen limitieren die Anwendbarkeit (Diener et al., 2008).

Tiefe Hirnstimulation

Bei der tiefen Hirnstimulation (THS) werden stereotaktisch Elektroden implantiert, die mit einem Stimulator verbunden sind und die steuerbar und reversibel elektrisch hochfrequenzstimuliert werden können. Stimuliert wird meist der Nucleus subthalamicus, in selteneren Fällen der Globus pallidus internus, oder der Nucleus ventrointermedius thalami. Durch die Stimulation kann - abhängig von Stimulationsort, -amplitude und -frequenz, eine Verbesserung der Kardinalsymptome Rigor, Tremor und Akinesie erzielt werden (Pollack et al., 1993). Der genaue Wirkmechanismus ist nicht geklärt. Es wird vermutet, dass die THS einen inhibitorischen Effekt auf den Nucleus subthalamicus und nachgeschaltete Neuronen in der Substantia nigra pars reticulata (SNr) hat, zudem werden neuroprotektive - und modulative Effekte auf nigrale dopaminerge Neurone diskutiert (Winter et al., 2010). Die Wirkungsstärke entspricht der von L- Dopa, bei geringerer Wirkungsfluktuation. L- Dopa induzierte Dyskinesien werden gemindert und es kann noch eine klinische Verbesserung erzielt werden, wenn die medikamentöse Behandlung nicht mehr wirkt (Eggert et al., 2012). Die perioperative Mortalität und schwere Morbidität liegt zwischen 0,5% und 3% (Diener et al., 2008, Deuschl et al., 2006). Wegen des operativen Risikos ist die THS noch medikamentös nicht einstellbaren Patienten mit IPS vorbehalten, die keine schwerwiegenden Begleiterkrankungen aufweisen (Diener et al., 2008).

Stammzelltherapie

Die Transplantation embryonaler und fetaler Stammzellen hat den Ersatz der untergegangenen dopaminergen Neurone zum Ziel. Vielversprechenden Studien am

Tiermodell konnten zeigen, dass transplantierte Stammzellen zu dopaminergen Neuronen differenzieren können und zu klinischen Verbesserungen führen (Snyder und Olanow, 2005). In größeren, doppelblinden klinischen Studien mit Scheinoperationen konnte hingegen kein signifikanter Effekt der Transplantation fetaler Zellen festgestellt werden (Snyder und Olanow, 2005, Deuschl, 2010). Es überlebte nur ein kleiner Teil der transplantierten Zellen, zudem traten häufig schwere Dyskinesien auf. Diese Therapiemethode ist daher noch nicht klinisch etabliert. Wichtige Faktoren für eine erfolgreiche Transplantation, wie die Art der zu transplanzierenden Stammzelle (embryonal, fetal), der optimale Transplantationsort, die Zellzahl des Transplantats und das notwendige Ausmaß einer Immunsuppression müssen in präklinischen Studien noch ausführlich erforscht werden um klinische Risiken besser einschätzen und vermeiden zu können (Snyder und Olanow, 2005). Da erhebliche ethische und rechtliche Bedenken in der Öffentlichkeit gegenüber der embryonalen und fetalen Stammzellforschung bestehen, müssen auch diese Aspekte weiter thematisiert werden.

Physische Aktivität und zusätzliche Behandlungsverfahren

Ergänzend zur medikamentösen oder chirurgischen Therapie kommt der physiotherapeutischen, ergotherapeutischen, logopädischen, diätetischen und psychosozialen Behandlung eine große Bedeutung zu (Siebert, 2008).

Parkinsonpatienten reduzieren das Ausmaß ihrer physischen Aktivität im Vergleich zu Gesunden gleichen Alters, haben weniger Muskelmasse, ein eingeschränktes Gleichgewicht und sie neigen wesentlich häufiger zu Stürzen (Goodwin et al., 2008). All dem lässt sich mit Physio- und Ergotherapie entgegenwirken. Auch Parameter motorischer Funktionen, wie Schrittlänge und Gehgeschwindigkeit (de Goede et al., 2001) und der Score im UPDRS Motorik- Test werden verbessert (Goodwin et al., 2008).

Aus prospektiven Studien ist bekannt, dass moderate bis starke sportliche Aktivität zwischen dem dreißigsten und vierzigsten Lebensjahr das Risiko später an IPS zu erkranken vermindert (Ahlskog et al., 2011).

Es wurde die Hypothese formuliert, dass Nervenzellen bei manifesten neurodegenerativen Erkrankungen durch Stimulation mittels körperlicher Aktivität vom Untergang geschützt und möglicherweise funktionell- relevant regeneriert werden können (Steiner et al., 2011). Als mögliche Mechanismen werden erhöhte Expression neurotropher Faktoren, erhöhte Konzentration synaptischer Proteine und

Neurotransmitter, Langzeitpotenzierung und zelluläre Plastizität im Sinne neugebildeter glialer- und neuronaler Zellen bei IPS diskutiert (Ahlskog et al., 2011, Steiner et al., 2011). Falls sich eine funktionelle Restauration neurodegenerativ veränderter Bereiche durch physische Aktivität bestätigen ließe, könnten Physiotherapie und Sport bei der Behandlung des IPS in Zukunft eine noch größere Bedeutung zukommen.

2.2 Tiermodelle für Morbus Parkinson

Das Auftreten des Parkinsonsyndroms ist nur beim Menschen bekannt. Dennoch gelang es, mehrere Tiermodelle zu etablieren, die zum pathophysiologischen Verständnis der Erkrankung, sowie zur Erarbeitung und Erprobung therapeutischer Konzepte beitragen konnten. Die wichtigsten und weitest verbreiteten Modelle basieren auf Substanzen, die selektiv dopaminerge Neurone im Gehirn der Versuchstiere zerstören und so parkinsonoide klinische Symptome und parkinsonoide histologische Bilder hervorrufen. Hierzu gehören, neben anderen, 6- Hydroxydopamin (6-OHDA), Rotenon, Paraquat und das in dieser experimentellen Untersuchung verwendete 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP). Des Weiteren existieren mehrere genetische Modelle, bei denen bspw. transgene Mäuse mutiertes α - Synuclein überexprimieren, oder Knockout- Mäuse mit Parkindeletion das zugehörige Protein nicht mehr exprimieren. Diese Modelle eignen sich besonders für die Untersuchung der präklinischen Phase der Erkrankung, da es nicht zum Untergang dopaminerger Neurone und nigrostriatalem Dopaminmangel kommt. Klinisch tritt kein PS auf, es konnten meist nur leichte olfaktorische und kognitive Defizite nachgewiesen werden (für Übersicht, s. Dawson et al., 2010).

2.2.1 6-OHDA

Das 6- Hydroxydopamin (6-OHDA) - Modell ist eines der ältesten Parkinsonmodelle (Ungerstedt, 1968). Das neurotoxische Dopaminderivat 6-OHDA wird selektiv in monoamine Neurone über Dopamin- und Noradrenalintransporter aufgenommen und die intrazellulär oxidierten Metaboliten des 6-OHDA entfalten ihre toxische Wirkung auf die betroffenen Zellen (Bezard et al., 1998). Da 6-OHDA die Blut-Hirn-Schranke nicht überwindet, ist eine systemische Gabe nicht möglich. Eine stereotaktische Infusion an den gewünschten Applikationsort ist erforderlich, typischerweise in die SN oder das Striatum. Diese stereotaktischen Operationen sind bei Mäusen aufgrund der vergleichsweise kleinen Gehirne im Vergleich zu Ratten schwieriger durchzuführen und

bergen ein erhöhtes Risiko, dass das Toxin nicht selektiv am intendierten Wirkort ankommt. Daher ist das 6-OHDA- Modell weitgehend eine Domäne der Forschung an Ratten oder größeren Säugern geblieben.

2.2.2 Rotenon

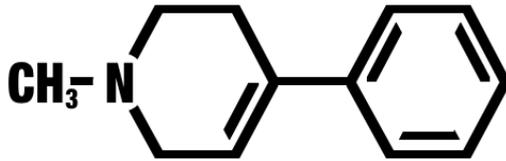
Das Insektizid Rotenon, das natürlicherweise in Barbascowurzeln vorkommt und in Südamerika als Fisch- und Pfeilgift Verwendung findet, inhibiert Komplex I der Atmungskette in Mitochondrien. Es führt zur Degeneration nigrostriataler Neurone und Bildung von Einschlusskörperchen, die den Lewy- Körperchen ähneln (Betarbet et al., 2000). Da jedoch experimentell nur ein Teil der Versuchstiere auf Rotenon anspricht und die Applikation aufgrund der Hydrophobie von Rotenon schwierig ist, ist die Verwendbarkeit eingeschränkt (Höglinger et al., 2006).

2.2.3 Paraquat

Das Herbizid Paraquat kann beim Menschen ein Parkinsonsyndrom auslösen (Sanchez-Ramos et al., 1987). Es wirkt, wie Rotenon und MPTP, auf die Atmungskette und beeinflusst die Dopaminsynthese (McCormak et al., 2002, Shimizu et al., 2003). Die hohe systemische Toxizität und variable histologische Ergebnisse lassen das Paraquatmodell noch nicht verlässlich erscheinen (Jackson-Lewis et al., 2012).

2.2.4 MPTP

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) entsteht als Nebenprodukt bei der chemischen Herstellung der heroartigen Designerdroge 1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxy-piperidin (MPPP). Als 1982 in Kalifornien mehrere junge Drogenabhängige nach i.v.- Injektionen von MPPP schwere, irreversible Parkinsonsyndrome entwickelten, erkannte man die neurotoxische Wirkung von MPTP (Langston et al., 1983). In den Folgejahren wurden MPTP- Parkinsonmodelle an unterschiedlichen Versuchstierspezies etabliert (Chiueh et al., 1984, Heikkila et al., 1984). Es zeigte sich, dass das Neurotoxin selektiv dopaminerge Neuronen, vornehmlich der SNpc, zerstört und damit histopathologische Kennzeichen des IPS imitiert wurden (Muthane et al., 1994).



Strukturformel von 1- Methyl- 4-
Phenyl- 1, 2, 3, 6- Tetrahydropyridin
(MPTP). Quelle: wikimedia

MPTP ist eine lipophile Substanz, welche die Blut- Hirnschranke überwindet und in Gliazellen zu 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) metabolisiert wird (Chiba et al., 1984). Über den Dopamintransporter (DAT) (Javitch et al., 1985) wird MPP⁺ selektiv in dopaminerge Nervenzellen aufgenommen und wirkt über eine Vielzahl von Mechanismen (für Übersicht, siehe Przedborski 2003), u.a. Hemmung des Komplex I der Atmungskette (Davey and Clark, 1996), toxisch auf die betroffenen Nervenzellen. In Folge dessen kommt es bei MPTP Applikation über mehrere Tage (subchronisches MPTP-Modell) zu Apoptose dopaminerger Neurone (Tatton et al., 1997). Bei akuterer Modellen, z.B. einem Mausmodell mit 4 x 20mg/kg KG alle 2h, scheint es dahingegen primär zur Nekrose der Neurone zu kommen (Jackson-Lewis et al., 1995). Der Effekt kann histologisch über die Quantifizierung der Abnahme Tyrosinhydroxylase- positiver (TH⁺) dopaminerger Neurone erfasst werden (Arai et al., 1990, Bezard et al., 1999). Dabei ist die Abnahme der TH- Immunreaktivität jedoch stärker ausgeprägt als der Neuronenverlust, wie durch zusätzliche Nissl-Färbung gezeigt werden konnte (Jackson-Lewis et al., 1995). Dennoch besteht eindeutig eine positive Korrelation zwischen TH- Immunreaktivität und dopaminergem Zelluntergang (Jackson- Lewis et al., 1995). Weitere messbare Parameter des MPTP Effekts sind die striatale Immunreaktivität von TH, die striatale Immunreaktivität des Dopamintransporters (DAT) und der striatale Dopamin- und DAT-gehalt (Ricaurte et al., 1987, Jakowec et al., 2004).

Die Vorteile des MPTP- Modells liegen in der Möglichkeit der systemischen Applikation, der zuverlässigen selektiven Läsion dopaminerger Neurone der Substantia nigra pars compacta und, zumindest bei Primaten, großer Ähnlichkeit der hervorgerufenen Symptome mit dem klinischen Bild von Morbus Parkinson (Langston et al., 1986). Nagetiere reagieren weniger empfindlich auf MPTP und die hervorgerufenen Symptome stimmen weniger mit denen eines menschlichen Parkinsonsyndroms überein (für Übersicht siehe Przedborski et al., 2001). Dennoch zeigt sich insbesondere bei C57BL/6 Mäusen eine reproduzierbare, histologisch und biochemisch nachweisbare Läsion der dopaminergen Neurone der SNpc. Lewy- Körperchen treten nicht auf.

Einige Studien am Mausmodell zeigten, dass zumindest ein Teil der Neurone nicht irreversibel geschädigt wird, da sich Dopamingehalt, DAT und striatale TH-Immunreaktivität einige Wochen nach MPTP- Läsion wieder erhöhten (Ricaurte et al., 1987, Jakowec et al., 2004, Höglinger et al., 2004). Andere Untersuchungen zeigten keine Erholung dopaminergener Neurone, mit gleichbleibend verminderter TH-Immunreaktivität (Fisher et al., 2004, Petzinger et al., 2007). In- vitro konnte gezeigt werden, dass MPTP in niedrigen Dosen bei kultivierten, embryonalen, dopaminergen Neuronen vorübergehend zu einem Verlust der TH- Immunreaktivität führt, die aber nach wenigen Tagen reversibel ist. Der Mechanismus ist dabei nicht bekannt. Längerfristig scheint dieses Phänomen keine Rolle mehr zu spielen (Sanchez- Ramos et al., 1988, Jackson- Lewis et al., 1995).

Die akute klinische Symptomatik in den ersten Stunden nach Injektion von MPTP bei Mäusen ist gekennzeichnet durch gesträubtes Fell, Buckelhaltung und einen steil angehobenen Schwanz ('Straub'scher Schwanz') (Linder et al., 1987, Mitra et al., 1992). Längerfristige klinische Veränderungen sind im Mausmodell inkonstant und experimentell schwierig nachweisbar. Rigor ist im Mausmodell schlecht untersucht und Tremor konnte, außer in wenigen Fällen vorübergehend nach Injektion, nicht nachgewiesen werden (Sedelis, 2001). Die Akinesie oder Hypokinesie wurde am intensivsten untersucht, die Studienlage ist jedoch nicht eindeutig was Ausmaß und Dauer der Veränderungen angeht. Es fand sich oftmals anfänglich ein Rückgang der motorischen Aktivität, der meist nach wenigen Tagen reversibel war, aber manchmal über viele Wochen anhielt. Seltener waren motorische Defizite nicht apparent oder es zeigte sich gar eine erhöhte motorische Aktivität im Vergleich zu Kontrollgruppen (Platel et al., 1986, Chia et al., 1996, Sedelis, 2001). In Untersuchungen der motorischen Aktivität im Laufrad zeigte sich bei akutem MPTP- Parkinsonmodell (4 x 20mg/kg KG alle 2h) passager eine verminderte Laufgeschwindigkeit, die aber nach 30 Tagen nahezu das Niveau von trainierten Kontrollmäusen erreichte (Fisher et al., 2004). In Untersuchungen zum subakutem Parkinsonmodell war diese Veränderung nur am Tag der MPTP- Injektion zu sehen (Leng et al., 2004).

2.3 Zelluläre Plastizität im ZNS

2.3.1 Definition

Der Begriff „Neuroplastizität“ beinhaltet vielfältige Möglichkeiten von Veränderung auf verschiedenen Ebenen des ZNS. Dazu gehören funktionelle Veränderungen auf subzellulärer, molekularer Ebene, wie z.B. Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression (Cooke und Bliss, 2006, Siebert, 2008), sowie Veränderung von Signalkaskaden und Regulation der Genexpression (McClung und Nestler, 2008). Ebenso strukturelle Veränderungen auf zellulärer Ebene, wie die Ausbildung neuer Dendriten, Axone und Synapsen (Harms und Dunaevsky, 2007), sowie Zellproliferation, -untergang, -umwandlung und –neuordnung, bis hin zu systemischen Veränderungen der Architektur ganzer Hirnareale, insbesondere in Folge pathologischer Veränderungen (Zilles et al., 1992), die letztlich aber auch auf molekularen und zellulären Veränderungen beruhen. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der proliferativen zellulären Plastizität, als Teil der strukturellen Plastizität. Proliferative zelluläre Plastizität umfasst dabei Neurogenese und Gliogenese, also die Neubildung und Differenzierung von Neuronen und Gliazellen aus Stammzellen und Progenitoren.

2.3.2 Stammzellen, Progenitoren, Präkursoren

Stammzellen sind definitionsgemäß fähig zur mitotischen Teilung und Selbsterneuerung, wie auch zur Differenzierung. Anhand des Grades der Möglichkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen werden Stammzellen bspw. als omnipotent bezeichnet, wenn sie sich zu jedem Zelltyp aller Zelllinien differenzieren können, oder als multipotent, wenn sie sich in die Zelltypen einer Zelllinie entwickeln können (Ilic und Polak, 2011). Im adulten Organismus kommen nur letztere vor.

Die Begriffe Progenitorzelle und Präkursorzelle werden in der Literatur teilweise synonym mit dem Begriff Stammzelle verwendet (Bull und Bartlett, 2005). Nach Bull und Bartlett können Progenitorzellen im Gegensatz zu Stammzellen uni- bis multipotent sein und sind nicht zur Selbsterneuerung fähig. Die Übergänge zur Stammzelle sind jedoch fließend und nicht unidirektional. So sind z.B. einige Zellen mit astrozytären Eigenschaften der SVZ zur Bildung von entdifferenzierten neuronalen Vorläufern fähig, die sich wiederum zu Neuronen differenzieren können (Doetsch et al., 1999).

Der Begriff Präkursorzelle bezeichnet nicht weiter definierte proliferierende Zellen (Bull und Bartlett, 2005). Adulte neurale Stammzellen können sich *in vitro* in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone differenzieren (McKay, 1997).

2.3.3 Neurogenese

Lange Zeit wurde angenommen, dass das adulte ZNS nicht zur Bildung neuer Nervenzellen fähig ist, wie die Aussage des spanischen Nobelpreisträgers für Medizin, Santiago Ramón y Cajal (1852-1934), aus dem Jahre 1914 zum Ausdruck bringt: „...*todo puede morir, nada puede regenerarse.*“ („*Alles kann sterben, nichts kann sich regenerieren*“). Und weiter: „*Corresponde a la ciencia del futuro cambiar, si es posible, este cruel decreto*“ [„*Es ist Aufgabe der Wissenschaft der Zukunft dieses grausame Dekret zu ändern, wenn es möglich ist*“], Ramon y Cajal, 1913/14). Er ahnte damals nicht, dass das adulte ZNS durchaus selbst regeneratives Potential besitzt und zur Bildung neuer Nervenzellen fähig ist. Diese Erkenntnis begann sich mit den Veröffentlichungen Joseph Altmans zur Zellneubildung in adulten Rattenhirnen in den 1960er Jahren durchzusetzen (Altman, 1962). In wenigen spezifischen Hirnregionen konnte Neurogenese aus Stammzellen in adulten Organismen verschiedener Spezies nachgewiesen werden (Kaplan und Hinds 1977, Eriksson et al., 1998, Palmer et al., 1995, Palmer et al., 1999, Gage, 2000). Entscheidend für den Nachweis der adulten Neurogenese waren dabei die sich verbessernden methodischen Möglichkeiten zum Nachweis proliferierender Zellen. Altman verwendete hierfür das *in vivo* verabreichte radioaktiv markierte Nukleosidanalogen ³H-thymidin, das bei der Mitose in die neu synthetisierte DNA eingebaut und im Zellkern anhand der Strahlung autoradiographisch visualisierbar wird (Altman, 1962, Rakic, 2002). Später wurde der Proliferationsnachweis durch die Bromodesoxyuridin (BrdU)- Methode noch erleichtert. BrdU ist ebenfalls ein Nukleosidanalogen, welches genauso in den neu synthetisierten DNA- Strang sich teilender Zellen inkorporiert wird wie ³H-thymidin. Es ist jedoch nicht radioaktiv, sondern kann mit monoklonalen Antikörpern immunhistochemisch oder mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Abgesehen von der fehlenden Strahlenbelastung bietet BrdU den Vorteil, dass es leichter mit zellspezifischen Markern kombiniert werden kann und über deren Kollokalisierung die Phänotypisierung der BrdU-markierten Zelle möglich wird (Cameron und McKay, 2001, Rakic, 2002, Siebert, 2008). Bei den Hirnregionen, in denen Neurogenese nachgewiesen werden konnte, handelt es sich um die subventrikuläre Zone (SVZ), lateral der Seitenventrikel gelegen und die subgranuläre Zone (SGZ) im Gyrus dentatus des Hippokampus. Erstere ist die Ursprungsregion proliferierender neuronaler Progenitoren (sog. „C-Zellen“), die sich aus spezialisierten Astrozyten („B-Zellen“) entwickeln, sich zu Neuroblasten differenzieren („A-Zellen“) und entlang des sog. rostralen Migrationsstroms in den Bulbus olfactorius

wandern, um dort als funktionelle Interneuronen Teil neuronaler Netzwerke zu werden (Lois und Alvarez-Buylla, 1993, Doetsch et al., 1999, Ming und Song, 2005). Im Hippokampus wandern proliferierte Zellen aus der SGZ in das angrenzende Stratum granulare, wo sie sich zu reifen Neuronen differenzieren, Eigenschaften reifer Neurone entwickeln und ebenfalls in neuronale Netzwerke integriert werden (van Praag et al., 2002, Kempermann et al., 2004). Ihre Funktion ist noch nicht restlos geklärt, aber es gibt Hinweise, dass sie bei Lern- und Gedächtnisprozessen eine Rolle spielen (Kempermann, 2002 und 2012).

Neben den beiden genannten neurogenen Hirnarealen bestehen noch andere Regionen des ZNS, in denen neurale Vorläuferzellen, mit dem Potential zur Differenzierung in reife Neurone, existieren (Palmer et al., 1995, Shihabuddin et al., 1997, Hermann et al., 2006a, Golmohammadi et al., 2008). Unter anderem im Kortex wurden auch *in situ* proliferierende Zellen mit neuronalen Charakteristika detektiert, mit allerdings deutlich geringerer Geneserate als in SVZ und SGZ (Gould et al., 2001). Andere Untersucher fanden keine Hinweise auf Neurogenese im Kortex (Koketsu et al., 2003). Zudem wurde diskutiert, ob die möglicherweise neuronalen, im Kortex detektierten Zellen nicht ursprünglich der SVZ entstammten (Gould und Gross, 2002).

Die Erkenntnis, dass Vorläuferzellen unterschiedlicher Hirnregionen zur Entwicklung neuronaler Eigenschaften fähig sind, wenn sie aus ihrer angestammten Umgebung entfernt werden, deutete aber darauf hin, dass die Beschränkung der Neurogenese auf bestimmte Gebiete des Gehirns eher auf regulatorische Signale aus der Umgebung, als auf den Mangel an Vorläuferzellen in nicht- neurogenen Gebieten zurückzuführen ist (Palmer et al., 1995). Da Progenitoren unterschiedlicher, nicht- neurogener Hirnregionen *in vitro* unterschiedliche Wachstumsfaktoren benötigen, um neuronale Eigenschaften zu entwickeln, zeigt sich jedoch auch, dass intrinsische Unterschiede zwischen verschiedenen Progenitorpopulationen bestehen und es nicht allein auf die Umgebung ankommt (Alonso, 1999).

Eine Möglichkeit, frühe neuronale Vorläuferzellen früh zu erfassen bietet Nestin. Dieses Intermediärfilament der Klasse IV wird in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert (Lendahl et al., 1990). Masahiro Yamaguchi entwickelte ein transgenes Mausmodell, bei dem das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter Regulation des Nestin-Promoters exprimiert wird (Yamaguchi et al., 2000). In Nestin exprimierenden Zellen dieser Tiere leuchtet das synthetisierte GFP grün und so wird die Visualisierung Nestin-

GFP- positiver Zellen unter dem Mikroskop möglich. Dies erleichtert die Detektion und Analyse neuronaler Vorläuferzellen und neuraler Stammzellen, wie beispielsweise in der SVZ und im Hippokampus gezeigt werden konnte (Yamaguchi, 2005).

2.3.4 Gliogenese

Bei der Erforschung proliferativer zellulärer Plastizität lag der Fokus auf der Neurogenese. Deshalb wurde versucht, neugebildete Neuronen von neugebildeten Gliazellen zu unterscheiden (Gould und Gross, 2002). Dies gelang mit der Einführung zahlreicher zellspezifischer Marker, der Einführung von BrdU, als *in-vivo* Marker proliferierter Zellen (Miller und Nowakowski 1988), und der konfokalen Mikroskopie, die die Möglichkeit bot, mehrfach Antikörper- markierte Zellen in mehreren Ebenen zu betrachten und zuverlässig zu identifizieren (s. Methoden). Dabei zeigte sich jedoch auch, dass die Grenzen zwischen Neurogenese und Gliogenese nicht so starr sind, wie zunächst vermutet (Alvarez-Buylla et al., 2001). So hat die neuronale Vorläuferzelle im Hippokampus Glia- ähnliche Eigenschaften (Kempermann et al., 2004, Steiner et al., 2006b), die Progenitoren der SVZ entstehen *in-vivo* aus Zellen, die Charakteristika von **Astrozyten** aufweisen (Doetsch et al., 1999), und sich *in vitro* wie multipotente neurale Stammzellen (Sanai et al., 2004) verhalten.

Reife **Oligodendrozyten**, die myelinisierenden Zellen des ZNS, gehen aus oligodendrozytären Progenitoren (OPCs) hervor. Obwohl der Großteil der Bildung zur Myelinisierung fähiger, reifer Oligodendrozyten während der Embryogenese und früh postnatal stattfindet, ist auch im adulten Organismus unter physiologischen Bedingungen noch eine geringe Rate an Oligodendrogenese nachweisbar. Insbesondere in der weißen Substanz trifft dies zu (Gensert und Goldman, 1997, Menn et al., 2006, Dimou et al., 2008). Bei demyelinisierenden Pathologien verstärkt sich die Oligodendrogenese reaktiv (Gensert und Goldman, 1996). Die OPCs sind anhand der Expression des Chondroitin Proteoglykans Neural/Glial Antigen 2 (NG2) identifizierbar. Sie verlieren diesen unreifen Zellmarker bei der Differenzierung zu postmitotischen, reifen Oligodendrozyten, die dann u.A. cyclische Nukleotid-Phosphodiesterase (CNPase) exprimieren (Baumann und Pham- Dinh, 2001).

Aber die Funktion NG2-positiver Zellen scheint nicht allein auf die Oligodendrogenese beschränkt zu sein. So bleiben einige Zellen dieses Typus, die im gesamten adulten ZNS anzutreffen sind, langfristig NG2-positiv und behalten die Fähigkeit zur

Proliferation bei (Dimou et al., 2008). Diese OPCs werden aufgrund ihrer stark verzweigten Morphologie teilweise als Polydendrozyten bezeichnet und zeigen unter *in vitro* Bedingungen Eigenschaften multipotenter neuraler Stammzellen (Raff et al., 1983, Kondo und Raff 2000, Nishiyama et al., 2009, Hermann et al., 2010). Des Weiteren zeigten OPCs auch *in vivo*, nach Transplantation in Glia-dezimierte Umgebung, die Fähigkeit zur Differenzierung in Astrozyten (Franklin et al., 1995). NG2-positive Zellen lassen zudem einige Glia- untypische, neuronale Merkmale erkennen. Sie haben im Hippokampus und Cerebellum synaptische Verbindungen zu neuronalen Axonen (Bergles et al., 2000, Lin et al., 2005), bilden teilweise Spannungsabhängige Ionenkanäle und verfügen über Rezeptoren für Neurotransmitter (Barres et al., 1990). Es wird daher diskutiert, ob NG2-positive Zellen eine heterogene Zellpopulation darstellen, die, neben Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia, möglicherweise als „vierter Gliotyp“ anzusehen sind (Peters 2004, Trotter et al., 2010) (Für Übersicht zu OPCs siehe: Nishiyama et al., 2009, Hermann et al., 2010).

Mikrogliale Zellen sind die Immuneffektorzellen des ZNS. Sie werden durch eine Vielzahl von Pathologien aktiviert. Es wird angenommen, dass mikrogliale Zellen Teil des mononukleären- phagozytotischen Systems sind und sie als zirkulierende Monozyten, oder als Vorläufer der monozytär- phagozytotischen Zelllinie ins ZNS einwandern und dort proliferieren können (Monif et al., 2010). Mikroglia werden dabei nicht mehr nur als bloße Makrophagen des Gehirns gesehen, sondern als heterogene Population die sowohl bei Inflammation als auch Antiinflammation im ZNS beteiligt ist (Doorn et al., 2012). Aktivierte Mikroglia zeigen eine meist 'amöboide' Form mit großem Soma und kurzen Fortsätzen, gegenüber stark ramifizierter Morphologie mit kleinem Soma in Ruhe. Sie sezernieren eine Vielzahl pro- und anti- inflammatorischer Zytokine und zeigen eine hohe migratorische Aktivität (Aloisi, 2001, Monif et al., 2010). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Mikroglia mittels ihrer Zellfortsätze Kontakt zu Synapsen herstellen, über deren funktionellen Zustand wachen, und sie bei Schädigung eliminieren (Wake et al., 2009).

2.3.5 Regulation der zellulären Plastizität

2.3.5.1 Mikromilieu

Die Entwicklung der Progenitoren in SVZ und SGZ hängt, wie bereits angedeutet (s. 2.3.2) von lokalen Stimuli ab, die sie in diesen neurogenen Hirnregionen empfangen. Dies wird als *Mikromilieu* oder *neuronal Nische* bezeichnet (Doetsch, 2003). So sind hippocampale Vorläuferzellen nicht zur Differenzierung in reife Neuronen fähig, wenn sie in andere, nicht-neurogene Hirnregionen, wie das Cerebellum, implantiert werden (Suhonen et al., 1996). Bei Implantation gleicher Zellen in den rostralen Migrationsstrom bilden sie dahingegen Charakteristika von Neuronen des Bulbus olfactorius aus (Suhonen et al., 1996, Gage, 2000). Es sind mittlerweile einige Faktoren bekannt, die an der Bildung des Mikromilieus beteiligt sind, z.B. unterschiedliche Wachstumsfaktoren wie FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2), EGF (Epidermal Growth Factor), Notch2, CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) TGF (Transforming Growth Factor) u.A. (Lie et al., 2002, Hagg 2005). Zudem Hormone, Neurotransmitter, die umgebenden Zellen, insbesondere Astrozyten, die einige der lokalen Faktoren freisetzen (Doetsch, 2003) und der Kontakt zu Kapillaren (Palmer et al., 2000). Wie genau diese Faktoren zusammenspielen, genetisch und epigenetisch kontrolliert - sowie intrinsisch wie extrinsisch reguliert werden, um Neurogenese zu ermöglichen ist nicht bekannt.

2.3.5.2 Dopaminerge Beeinflussung zellulärer Plastizität

Als Regulatoren der zellulären Plastizität und der Neurogenese im Speziellen, sind, wie bereits erwähnt, Hormone, lokale Mediatoren und Neurotransmitter zu nennen (für Übersicht s. Hagg 2005). Von Dopamin ist seit längerem bekannt, dass es bei der Ontogenese des zentralen Nervensystems eine bedeutsame Rolle spielt und beispielsweise Zellzyklus und Zelldifferenzierung während der embryonalen Neurogenese beeinflusst (Ohtani et al., 2003).

Es zeigte sich zudem, dass Veränderung der Ausschüttung von Neurotransmittern, wie sie bei neurodegenerativen Erkrankungen, z.B. Morbus Parkinson vorkommen, die adulte Neurogenese beeinflussen. So konnten in Hippokampus und SVZ gezeigt werden, dass Dopamin auch im adulten Organismus ein wichtiger Faktor ist, der die Proliferation neuronaler Vorläufer stimuliert (Höglinger et al., 2004). In genannter Untersuchung stellte sich heraus, dass nach Dopamindepletion, sei es durch das MPTP-Modell bei Mäusen, oder das PS bei Menschen, eine verminderte Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen in der SVZ und der SGZ des Hippokampus vorliegt. Die

in der SVZ von Dopamin beeinflussten neuronalen Vorläufer scheinen dabei insbesondere Zellen zu sein, die die Dopaminrezeptoren D2, D3 und D4, zusammenfassend als D2-ähnliche Rezeptoren bezeichnet, exprimieren („C-Zellen“) (Höglinger et al., 2004). Die dopaminergen Projektionen entstammen dem Mittelhirn, insbesondere der Substantia nigra pars compacta (Freundlieb et al., 2006). *In vitro* führt eine Aktivierung der D2-ähnlichen Rezeptoren auf C-Zellen, die aus der SVZ explantiert worden waren, zu einer verstärkten Proliferation dieser Vorläuferzellen (Höglinger et al., 2004).

D2- und D3- Rezeptoren werden ebenfalls von oligodendrozytären Vorläufern und, in geringerem Maße, von reifen Oligodendrozyten exprimiert (Bongarzone et al., 1998, Howard et al., 1998, Rosin et al., 2005). Dopamin scheint über D3-Rezeptoren die Proliferation zu fördern und die Differenzierung zu regulieren. Dopaminagonisten hemmen dabei die Bildung von Myelinscheiden (Bongarzone et al., 1998). Andere Studien zeigten einen protektiven Effekt auf das Überleben von Oligodendrozyten *in vitro*, durch D2- und D3- Agonisten bei oxidativem Stress (Rosin et al., 2005).

2.3.5.3 Physiologische Stimuli

Neben intrinsischen Faktoren des Mikromilieus haben auch extrinsische Faktoren Einfluss auf Zellproliferation, Differenzierung und Überleben. Dazu gehören, neben pathologischen Stimuli, wie Trauma, Stress, Ischämien, Blutungen, epileptischen Anfällen (Parent et al., 1997, Arvidsson et al., 2002, Gould und Gross, 2002), auch physiologische Stimuli, wie freiwillige physische Aktivität. Freiwilliges Laufen im Laufrad (RUN) stimuliert, neben einer verbesserten motorischen Leistungsfähigkeit (Fisher et al., 2004), bei Mäusen in der SGZ des Gyrus dentatus im Hippokampus auch die Proliferation von neuronalen Vorläufern (van Praag et al., 1999).

Eine reizreiche Umgebung (enriched environment, ENR) hat ebenfalls signifikante, wenn auch geringere Auswirkungen auf die Zellproliferation, fördert aber deutlich das Überleben von neugebildeten Neuronen (Kempermann et al., 1997, Kronenberg et al., 2003). Physische Aktivität kann dabei durch verstärkte Vorläuferproliferation die Grundlage für eine erhöhte Neurogenese legen, insofern kognitive und soziale Stimuli, im Sinne einer reizreichen Umgebung folgen oder gleichzeitig wirken (Fabel et al., 2009). Die genaue Wirkungsweise von RUN und ENR ist nicht bekannt. Als Effektormechanismus physischer Aktivität gilt aber beispielsweise die erhöhte Expression von Dopamin D2- Rezeptoren im MPTP- Parkinsonmodell der Maus

(Vučković et al., 2010). Des Weiteren werden der Notch1-Signalweg, NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)- Rezeptoren und BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) als mögliche Effektoren von physiologischen Stimuli diskutiert (Rossi et al., 2006, Brandt et al., 2010).

2.3.6 Zelluläre Plastizität der Substantia nigra

Die Hoffnung auf orthotopen Zellersatz aus möglichen endogenen neuronalen Progenitoren, als kausale Therapie bei Morbus Parkinson, ließ auch die SN ins Blickfeld der Neurogeneseforschung rücken. Nach anfänglichen Hinweisen auf kontinuierliche Neurogenese in der adulten SN, unter physiologischen und pathologischen Bedingungen (Zhao et al., 2003, Shan et al., 2006), konnte jedoch nach zahlreichen Untersuchungen unterschiedlicher Forschergruppen keine Neurogenese in der adulten SN nachgewiesen werden (Frielingsdorf et al., 2004, Cooper und Isacson 2004, Steiner et al., 2006a, Höglinger et al., 2007, Siebert, 2008, Hermann et al., 2009 u.A.). Die Abweichungen der Untersuchungsergebnisse wurden von Letzteren auf methodische Unterschiede in den erstgenannten Studien zurückgeführt.

Eine Arbeitsgruppe um Lie konnte aus der SN neuronale Vorläufer isolieren, die sich *in vitro* und nach Transplantation in den Gyrus dentatus des Hippokampus zu Neuronen differenzierten. Bei Replantation der isolierten Progenitoren in die SN fand keine Differenzierung zu Neuronen statt, es waren ausschließlich gliale Marker nachweisbar (Lie et al., 2002), was gegen ein neuronales Potential im Mikromilieu der SN sprach.

Doch auch das Vorhandensein von neuronalen Vorläufern in der SN wird kontrovers diskutiert. So konnte die Dresdener Arbeitsgruppe um Hermann Lies Ergebnisse nicht reproduzieren und fand keine Hinweise auf Neurogenese oder neuronale Vorläuferzellen (Hermann et al., 2009). Die Ergebnisse von Lie und Mitarbeitern führten sie auf 'Verunreinigung' der isolierten SN mit Material aus der periventriculären Region zurück.

Als bestätigt gilt jedoch, dass die Substantia nigra eine zwar geringe, aber konstante zelluläre Proliferation aufweist (Kay und Blum 2000, Chen et al., 2005, Steiner et al., 2006a, Siebert, 2008).

Bei Untersuchungen der nigralen Plastizität zeigte sich, dass in der SNpc, als Ursprungsregion vieler dopaminergen Fasern, Dopamin als Regulator Einfluss auf die Zellproliferation hat (Steiner et al., 2006a). Auch physiologische Stimuli zeigten einen Einfluss auf die zelluläre Plastizität. Im 6-OHDA Parkinsonmodell der Ratte war die

Gesamtzahl proliferierter Zellen unverändert und die Zahl gebildeter astrozytärer- und mikroglialer Zellen vermindert. Die größeren Veränderungen zeigten sich jedoch im Zusammenspiel von 6-OHDA mit physiologischen Stimuli, die aus einer reizreichen Umgebung in Kombination mit Training der Ratten auf einem Rotarod (rotierender Zylinder, ähnlich einem Laufband) bestanden. Die NG2-positive Zellpopulation proliferierte unter diesen Bedingungen verstärkt. Dies korrelierte dabei mit verbessertem Abschneiden der 6-OHDA-läsionierten Ratten bei Tests der Motorik. Die motorische Verbesserung trat aber erst nach 7 Wochen auf, so dass ursächlich auch ein rein peripherer Trainingseffekt der Ratten, unabhängig von der zellulären Plastizität diskutiert wurde (Steiner et al., 2006a, Siebert, 2008).

Die Zelltypisierung der proliferierenden Populationen in der SN der Ratte gelang nur für einen Teil der Zellen. Bei den mittels Immunreaktivität charakterisierbaren Populationen handelte es sich, neben genannten NG2-positiven Zellen, mikroglialen und astrozytären Zellen, um Nestin-positive Zellen, demnach neurale Vorläufer (Lie et al., 2002, Chen et al., 2005, Steiner et al., 2006a). Diese machten aber nur einen kleinen Teil aller proliferierten Zellen aus. Andere Studien zeigten unter pathologischen Bedingungen, wie der Applikation von MPTP, eine Zunahme der mikroglialen und astrozytären Zellen (Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999). Es verblieb aber bei allen Untersuchungen ein großer Teil BrdU-positiver Zellen der nicht identifizierbar war.

Reaktive Astrozyten und aktivierte mikrogliale Zellen, als Kennzeichen von Neuroinflammation, wurden post mortem auch in den Gehirnen von Parkinsonpatienten vorgefunden (Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999). Die gliale Reaktion geht sowohl mit einer Aktivierung von Astrozyten als auch mit einer leicht erhöhten astrozytären Proliferation einher. Die mikrogliale Aktivierung bei M. Parkinson und dem MPTP-Tiermodell ist stärker ausgeprägt als die astrozytäre (Mirza et al., 2000, Teismann et al., 2003). Ob die gliale Reaktion bei M. Parkinson und nach MPTP-Gabe in Folge der Degeneration dopaminergener Neurone auftritt, oder an der Ursache des dopaminergen Zelluntergangs beteiligt ist, ist unklar (Miller et al., 2011).

Die Rolle der Oligodendrozyten, speziell der adulten Oligodendroglie, bei Morbus Parkinson und dessen Tiermodellen ist wenig untersucht (McGeer und McGeer 2008). MPTP führt im Parkinsonmodell der Maus zu einer Reduktion reifer Oligodendrozyten im Striatum, was mittels des Oligodendrozytenmarkers Cyclische

Nukleotid-Phosphodiesterase (CNPase) nachweisbar war (Tagaki et al., 2007). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten in einigen nigralen BrdU-positiven Zellen oligodendrozytäre Charakteristika (Chen et al., 2005).

2.4 Fragestellung

In dieser tierexperimentellen Studie sollte der Effekt eines verminderten zentralnervösen Dopamingehalts und dessen Substitution auf die zelluläre Plastizität in der Substantia nigra von adulten Mäusen untersucht werden. Des Weiteren sollte die Wirkung physiologischer Stimuli auf die nigrale Zellproliferation und das Überleben neuer nigraler Zellen gesunder und dopamindepletierter Mäuse evaluiert werden. Ziel war es zudem, die proliferierten Zellpopulationen immunologisch zu typisieren, mögliche Differenzierungsvorgänge über einen längeren Beobachtungszeitraum zu erfassen und das neurogene Potential endogener neuraler Vorläuferzellen zu untersuchen. Zusammenfassend sollten die Fragen, die es in dieser Arbeit experimentell zu beantworten galt, folgende sein:

- 1.) Welche Zellen proliferieren in der adulten SN und wie differenzieren sich diese Zellen über einen längeren Beobachtungszeitraum?
- 2.) Wird die zelluläre Plastizität der SN dopaminerg beeinflusst?
- 3.) Führt die Substitution eines Dopaminmangels zu einer Wiederherstellung des physiologischen Levels der nigralen zellulären Plastizität?
- 4.) Fördern die physiologischen Stimuli RUN und ENR die nigrale Zellproliferation und das Zellüberleben und können sie einen möglichen antiproliferativen Effekt der Dopamindepletion kompensieren?
- 5.) Besteht endogenes neurogenes Potential in der adulten Substantia nigra der Maus?

Mit der Beantwortung dieser Fragen erhoffen wir uns, zum Verständnis der zellulären proliferativen Prozesse in der SN und deren Regulation beizutragen.

Dies könnte wertvolle Hinweise für weitere Studien zum Thema liefern und eine Grundlage für Untersuchungen zur Erforschung neuer Therapieoptionen bei Schädigung der SN und des dopaminergen Systems leisten.

3. Methoden

3.1 Experimentelles Design

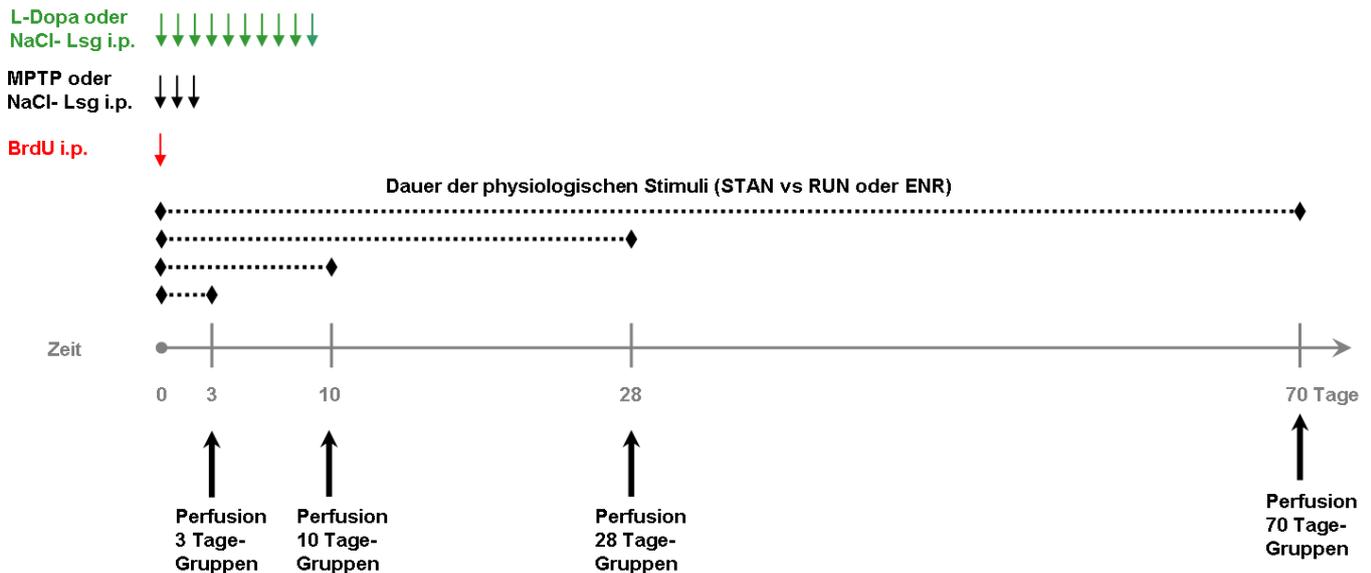


Abb.1 Schematische Darstellung des experimentellen Designs
Klaissle et al. 2012

Um untersuchen zu können, welche Zellpopulationen in der Substantia nigra von adulten Mäusen proliferieren und wie sie sich im Folgezeitraum quantitativ verändern und differenzieren, wurden je fünf Versuchstiere unterschiedlichen Gruppen zugeordnet.

So wurden alle Mäuse entweder dem MPTP-Parkinsonmodell oder Kontrollgruppen zugeteilt. Bei einem Teil der Tiere wurde Dopamin (L-Dopa- und Benserazid) substituiert. Zur Untersuchung des Einflusses physiologischer Stimuli auf die nigrale zelluläre Plastizität wurden die Tiere zudem unterschiedlichen Handlungsbedingungen ausgesetzt. Die Mäuse wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Injektion des Proliferationsmarkers Bromodesoxyuridin (BrdU) (s.u.) getötet und das Gewebe der Substantia nigra histologisch aufgearbeitet. Untersucht wurde somit 1. der Effekt des Parkinsonmodells (MPTP versus Kontrolle) auf die nigrale zelluläre Proliferation, das Überleben der neu gebildeten Zellen und die Differenzierung der proliferierenden Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach BrdU- Applikation, 2. der Effekt einer Dopaminsubstitution auf die nigrale Zellproliferation und Zelldifferenzierung bei dopamindepletierten und gesunden Tieren. Hierfür wurde zusätzlichen Versuchsgruppen über 10 Tage L-Dopa (20mg/kg KG + Benserazid 5mg/kg/KG) intraperitoneal injiziert,

3. der Effekt unterschiedlicher Haltungsbedingungen, bzw. physiologischer Stimuli (Standardbedingungen (STAN) versus Laufradkufig (RUN) versus reizreiche Umgebung (ENR) s.u.) im Zusammenspiel mit dem Parkinsonmodell und der Dopaminsubstitution. Die Gehirne der Tiere aller Gruppen wurden mit Methoden der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz untersucht. Abschließend wurde das neurogene Potential der SN und ihrer Nestin-GFP positiver Vorläufer *in vitro*, in Sphärenkultur untersucht. Die Versuchstiere fur immunhistochemische- und Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden in 30 Gruppen eingeteilt. Weitere 15 Tiere wurden fur die Zellkultur in zwei Gruppen eingeteilt (s.u.).

Versuchstiergruppen fur Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Gruppe	Tieranzahl (n)	Behandlung (i.p.) Je 1x anTag 0-2	BrdU - Appl.	Stimulus	Perfusion (Tage nach BrdU- Appl.)
Kontrolle STAN 3d	6	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Standard 3 Tage	3
Kontrolle STAN 10d	6	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Standard 10 Tage	10
Kontrolle STAN 28d	5	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Standard 28 Tage	28
Kontrolle STAN 70d	7	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Standard 70 Tage	70
MPTP STAN 3d	5	MPTP	Tag 0	Standard 3 Tage	3
MPTP STAN 10d	6	MPTP	Tag 0	Standard 10 Tage	10
MPTP STAN 28d	5	MPTP	Tag 0	Standard 28 Tage	28
MPTP STAN 70d	5	MPTP	Tag 0	Standard 70 Tage	70
Kontrolle RUN 3d	5	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Laufrad 3 Tage	3
Kontrolle RUN 10d	6	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Laufrad 10 Tage	10
Kontrolle RUN 28d	6	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Laufrad 28 Tage	28
Kontrolle RUN 70d	5	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Laufrad 70 Tage	70
MPTP RUN 3d	5	MPTP	Tag 0	Laufrad 3 Tage	3
MPTP RUN 10d	6	MPTP	Tag 0	Laufrad 10 Tage	10
MPTP RUN 28d	5	MPTP	Tag 0	Laufrad 28 Tage	28
MPTP RUN 70d	5	MPTP	Tag 0	Laufrad 70 Tage	70
Kontrolle ENR 3d	6	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Reizr. Umg. 3 Tage	3
Kontrolle ENR 10d	5	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Reizr. Umg. 10 Tage	10
Kontrolle ENR 28d	5	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Reizr. Umg. 28 Tage	28
Kontrolle ENR 70d	5	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Reizr. Umg. 70 Tage	70
MPTP ENR 3d	5	MPTP	Tag 0	Reizr. Umg. 3 Tage	3
MPTP ENR 10d	6	MPTP	Tag 0	Reizr. Umg. 10 Tage	10
MPTP ENR 28d	5	MPTP	Tag 0	Reizr. Umg. 28 Tage	28

MPTP ENR 70d	5	MPTP	Tag 0	Reizr. Umg. 70 Tage	70
L-Dopa Kontrolle STAN 10d	6	L- Dopa Tag 0-9	Tag 0	Standard 10 Tage	10
L-Dopa Kontrolle RUN 10d	5	L- Dopa Tag 0-9	Tag 0	Laufgrad 10 Tag	10
L-Dopa Kontrolle ENR 10d	6	L- Dopa Tag 0-9	Tag 0	Reizr. Umg. 10 Tage	10
L-Dopa MPTP STAN 10d	5	MPTP Tag 0-2, L- Dopa Tag 0-9	Tag 0	Standard 10 Tage	10
L-Dopa MPTP RUN 10d	5	MPTP Tag 0-2, L- Dopa Tag 0-9	Tag 0	Laufgrad 10 Tag	10
L-Dopa MPTP ENR 10d	6	MPTP Tag 0-2, L- Dopa Tag 0-9	Tag 0	Reizr. Umg. 10 Tage	10

Tabelle 1

3.2 Versuchstiere

Es wurden 8-12 Wochen alte weibliche, transgene pNestin- GFP C57BL/6 Mäuse verwendet, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter Kontrolle des Nestin-Promotors exprimieren (Yamaguchi et al., 2000). Nestin exprimierende Zellen dieser Mäuse weisen eine grüne Eigenfluoreszenz auf und können so mikroskopisch detektiert werden. Bei Nestin handelt es sich um ein Intermediärfilament der Klasse IV, welches in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wird (Lendahl et al., 1990).

Die Daten in der Literatur zum Parkinsonmodell der Maus wurden meist anhand männlicher C57BL/6 Mäusen erhoben (Sedelis et al., 2000, Höglinger et al., 2004). Es ist bekannt, dass Geschlechtshormone wie Estradiol die hippocampale Neurogenese beeinflussen (Bowers et al., 2010). Dabei wird auch diskutiert, ob Zellproliferation und Neurogenese bei weiblichen Nagern gegenüber Männchen erhöht ist (Galea et al., 2006). Dies zeigte sich beispielsweise bei Wiesenwühlmäusen im Gyrus dentatus des Hippocampus (Galea et al., 1999). Beim hier verwendeten C57BL/6 Mausstamm konnten diesbezüglich keine Unterschiede gefunden werden (Lagace et al., 2007). Hinsichtlich der nigralen zellulären Plastizität liegen keine Untersuchungen vor, die geschlechtliche Unterschiede nahelegen.

Bei Haltung in größeren Gruppen, wie sie hier bei den Gruppen in reizreicher Umgebung durchzuführen war, muss bei männlichen Mäusen im Vergleich zu weiblichen Artgenossen damit gerechnet werden, dass es zu Territorialkämpfen mit teils schweren Verletzungen kommt (Arras, 2008). Daher und weil in vorherigen Studien

unserer Arbeitsgruppe ebenfalls Daten weiblicher Tiere erhoben wurden, kamen für diese experimentelle Studie weibliche Mäuse zur Anwendung.

Die Mäuse wurden eigens für die Versuche in der Versuchstierzucht der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité gezüchtet. Sämtliche Tierversuche wurden entsprechend der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes § 8 Absatz 1 durchgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt.

3.3 Zeitlicher Ablauf

Die Tiere wurden zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten nach MPTP- Injektion und BrdU- Injektion zur Organentnahme und immunhistochemischer Analyse getötet: 3 Tage, 10 Tage, 28 Tage und 70 Tage nach BrdU- und erster MPTP- Injektion.

Die Untersuchungszeitpunkte wurden in Anlehnung an Höglingers Untersuchungen des Einflusses von Dopamin auf die hippokampale und subventrikuläre Neurogenese (Höglinger et al., 2004) gewählt, um eine initiale Proliferationsinduktion ebenso zu erfassen, wie den zeitlichen Verlauf der Differenzierung von proliferierenden oder neu gebildeten Zellpopulationen (Kempermann et al., 2004).

3.4 Haltungsbedingungen

Um zu untersuchen welchen Einfluss physiologische Stimuli auf die zelluläre Plastizität der Substantia nigra haben, wurden die Versuchstiere verschiedenen Haltungsbedingungen mit unterschiedlichen Reizen zugeteilt. So wurde ein Drittel der Tiere in Standardkäfigen ohne zusätzliche Reize gehalten. Ein weiteres Drittel der Tiere hatte in Laufradkäfigen Zugang zu erhöhter freiwilliger physischer Aktivität. Das verbleibende Drittel der Mäuse wurde in Käfigen mit reizreicher Umgebung gehalten.

3.4.1 Haltung unter Standardbedingungen

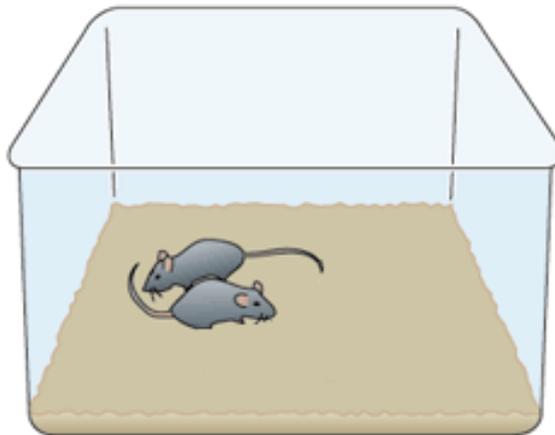


Abb. 2 Modifiziert nach Van Praag et al., 2000.

Die Tiere wurden zu zweit in standardisierten Käfigen mit den Abmessungen 267 x 207 x 140mm (Tecniplast, Buguggiate, Italien) gehalten. Alle Tiere wurden in einem regelmäßigen Zyklus von 12h Helligkeit und 12h Dunkelheit gehalten. Sie hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Temperatur lag konstant bei 18°C, die Luftfeuchtigkeit betrug 50%.

3.4.2 Haltung in Laufradkäfigen

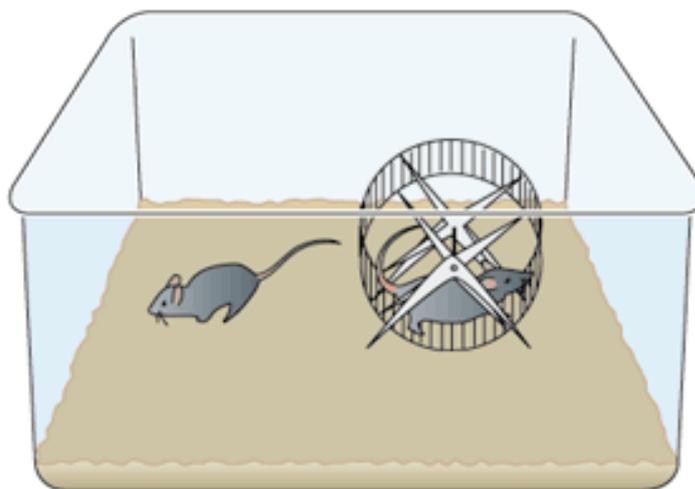


Abb. 3 Modifiziert nach Van Praag et al., 2000.

Die Tiere wurden paarweise in standardisierten Laufradkäfigen mit den Abmessungen 365 x 207 x 140mm (Tecniplast, Buguggiate, Italien) gehalten. Die Mäuse hatten jederzeit freiwilligen Zugang zum Laufrad. Die Laufaktivität im Laufrad wurde mit einem

Zählmodul gemessen (tico 731, Hengstler, Deutschland). Dabei erfasste der Zähler Bewegungen des Laufrads in beide Richtungen ab einer Vierteldrehung des Laufrads. Es werden die pro Käfig in 24h detektierten Gesamtlaufstrecken angegeben. Hierzu werden die detektierten Umdrehungen mit dem Umfang des Laufrades (0,722m) multipliziert. Alle weiteren Bedingungen entsprachen den Standardbedingungen.

3.4.3 Haltung in reizreicher Umgebung

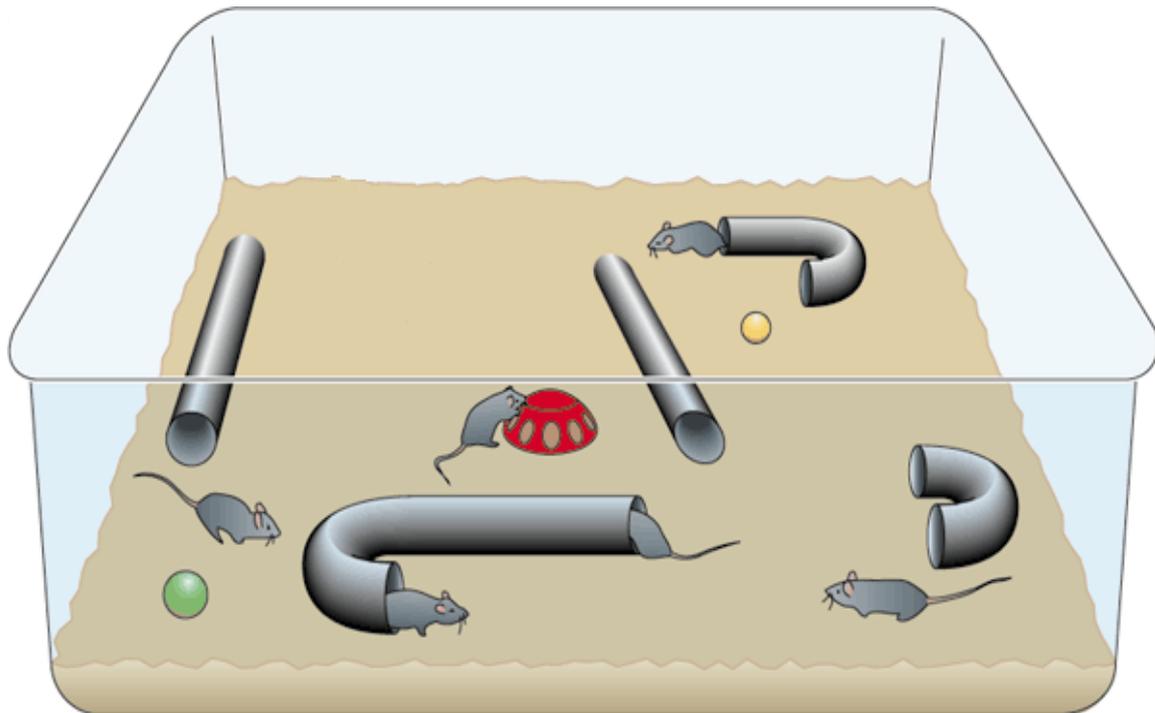


Abb. 4 Modifiziert nach Van Praag et al., 2000.

Die Mäuse wurden in Gruppen von je fünf Tieren in speziell angefertigten großflächigen Käfigen mit den Abmessungen 740 x 740 x 250mm gehalten (Einzelanfertigung, Firma Bachnik, Bernau). Die Käfige waren mit geschützten Schlafstellen, Pappe und Papier als Material zum Nestbau, mehreren Plastikrohren und einer Klettervorrichtung versehen. Die Konfiguration der Plastikrohre wurde alle zwei Tage verändert. Das Material zum Nestbau wurde zweimal wöchentlich ausgetauscht.

So bestand neben einem größeren Platzangebot eine bessere Möglichkeit zur sozialen Interaktion, sowie durch die zusätzlichen veränderlichen Objekte eine Stimulation des explorativen Verhaltens. Der Aufbau der reizreichen Umgebung ist an den von Kempermann et al., 1997 angelehnt (für Übersicht siehe van Praag et al., 2000).

Alle weiteren Bedingungen stimmten mit den Standardbedingungen überein.

3.5 Das MPTP- Parkinsonmodell der Maus

3.5.1 Injektionsschema

Das MPTP-Modell ist eines der meist genutzten tierexperimentellen Parkinsonmodelle (Jackson-Lewis et al., 2007). Der Mausstamm C57BL/6 ist für das MPTP-Modell besonders geeignet, da hierbei ein größerer Teil der dopaminergen Neurone der SNpc läsiert werden kann als bei anderen Mausstämmen (Hamre et al., 1999). Zur gezielten Läsion dopaminergener Neurone wurde den Tieren intraperitoneal (i.p.) MPTP-HCl (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA,) verabreicht. Die Mäuse erhielten an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine Injektion MPTP- HCl i.p. (je 20mg/kg KG, folglich kumulativ 60 mg/kg KG). Bei dieser Applikationsfrequenz und -menge handelt es sich um eine Variante des subchronischen MPTP- Parkinsonmodells, bei dem üblicherweise 20- 30mg/kg KG täglich über 5 Tage i.p. injiziert werden, wobei es zu einer zuverlässigen Reduktion der TH-positiven dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta um 40- 50% kommt (Tatton und Kish, 1997, Vila et al., 2000, Jackson- Lewis und Przedborski, 2007). Das Modell wurde für männliche C57/BL 6 Mäuse, die mindestens 22g wogen etabliert. Für diese Arbeit wurden jedoch weibliche Tiere verwendet, die oftmals leichter (durchschnittlich 20g) sind und bei denen häufiger akute Todesfälle innerhalb der ersten 24h nach Injektion auftreten, vermutlich durch kardiovaskuläre Nebenwirkungen und Verminderung der Körpertemperatur (Jackson-Lewis und Przedborski, 2007). Andere Untersuchungen an C57/Bl/6 Mäusen zeigten, dass auch einmalige Injektionen von 30-40 mg/kg KG MPTP zu einer um 20% reduzierten TH- Immunreaktivität führen, die Variabilität der Läsion aber höher ist (Kupsch et al., 1992). Wir reduzierten die Gesamtdosis und die Applikationsdauer daher wie oben genannt, um stabile Läsionen bei möglichst niedriger Mortalität zu erzielen. Kontrollen erhielten zur selben Zeit je 0,1ml 0,9% NaCl- Lösung i.p.

3.5.2 Sicherheitsmaßnahmen

Da MPTP beim Menschen bereits in niedrigsten Dosen hochtoxisch ist, Symptome auslösen kann, die von denen bei Morbus Parkinson klinisch nicht zu unterscheiden sind (Langston et al., 1986, Przedborski et al., 2001) und Einzelfälle bekannt sind, bei denen ein Parkinsonsyndrom nach Kontakt mit MPTP auftrat (Langston et al., 1983), sind strenge Sicherheitsmaßnahmen notwendig um das Risiko einer schädigenden Wirkung zu minimieren. Deshalb erfolgte die Verwendung von Lösungen des nichtflüchtigen Salzes MPTP- HCl, sowie dessen Handhabung mit Schutzkleidung

(Nitril- Handschuhe plus Latexhandschuhe, Schutzanzug, Schutzbrille, Mundschutz). Die Applikation und Haltung der behandelten Mäuse erfolgte in abgetrennten, als Gefahrenbereich gekennzeichneten Räumen. Die Versuchstiere befanden sich bis 72h nach der letzten MPTP- Injektion in Einmalkäfigen. In Haltungsbedingungen, die dies nicht zuließen (z. B. reizreiche Umgebung), wurden Käfigboden und -wände mit Einwegbögen aus Plastik abgedeckt. Die Einmalkäfige, Restmaterialien und kontaminiertes Material wurden der Entsorgung durch Hochtemperaturverbrennung zugeführt (Przedborski et al., 2001, Sedelis, 2001). Das Tierpflegepersonal wurde im Umgang mit MPTP- behandelten Tieren durch persönliche Einführung geschult.

3.6 BrdU- Applikation

Alle Tiere erhielten am Tag der ersten MPTP- Injektion eine einmalige intraperitoneale Injektion des Thymidinanalogons BrdU (50mg/kg KG; Sigma- Aldrich), zur Markierung sich teilender Zellen.

Hierfür wurde BrdU zunächst in 0,9% NaCl gelöst und filtriert (Kempermann et al., 1997, Steiner et al., 2004). Es erfolgte eine einmalige Injektion, um einen klar festgelegten Startpunkt zu definieren, an dem mitotisch aktive Zellen markiert werden und um deren phänotypische Differenzierung an den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten bestimmen- und zeitlich einordnen zu können. Bei oftmals verwendeten Injektionsschemata über längere Zeiträume (Kempermann et al., 1997), die den Vorteil bieten, dass eine größere Anzahl proliferierender Zell markiert werden kann, wäre eine genaue Bestimmung des Alters der markierten Zellen nicht möglich und das Risiko, dass nicht- mitotische Zellen bei Apoptose oder DNA- Reparatur markiert werden stiege an (Cameron und McKay, 2001).

3.7 Medikamentöse Behandlung mit L- Dopa und Benserazid

Durch eine medikamentöse Substitution von Dopamin sollte überprüft werden, ob Effekte der durch MPTP hervorgerufenen Dopamindepletion beeinflusst werden können. Hierzu erhielten zusätzliche Gruppen von MPTP- und Kontrolltieren über 10 Tage täglich eine intraperitoneale Injektion mit L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Levodopa, L- Dopa, 20mg/kg KG; Ferak, Berlin) und dem Decarboxylasehemmer Benserazid (5mg/kg/KG; Sigma- Aldrich). Diese Dosis führt nach Angaben aus der Literatur zu einer deutlichen Besserung der motorischen Krankheitssymptome, die durch das MPTP

ausgelöst werden können (Fredriksson et al., 1990). Die erste Injektion erfolgte dabei am Tag der ersten MPTP- Injektion, bzw NaCl- Injektion.

3.8 Transkardiale Perfusion

Zum jeweils bestimmten Zeitpunkt wurden die Versuchstiere transkardial perfundiert. Zunächst erfolgte eine tiefe Analgosedierung mittels intraperitonealer Applikation einer Mischlösung aus Ketamin (100 mg/kg KG; Intervet, Unterschleißheim) und Xylazin (16mg/kg KG; Intervet). Nach Überprüfen einer ausreichenden Anästhesie mittels Schmerzreiz, erfolgte eine Fixierung der Mäuse in Rückenlage, eine Thorakotomie, die Darstellung des Herzens und Inzision des rechten Atriums zum Abfluss des Blutes. Über eine Inzision des linken Ventrikels an der Apex cordis wurde eine stumpfe Perfusionskanüle eingeführt und fixiert. Über die Kanüle wurde zunächst die systemische Perfusion mit 50ml Phosphatpufferlösung (PBS) und daraufhin die Perfusion mit 50ml 4% Paraformaldehyd- (PFA) Lösung, zur Fixierung der Gehirne, durchgeführt.

Nach Abschluss der Perfusion erfolgte die Dekapitation, Präparation und Entnahme der Gehirne.

3.9 Fixierung, Verarbeitung und Aufbewahrung

Die Gehirne wurden über Nacht in 4% PFA-Lösung bei 4°C gelagert, daraufhin für 3 Tage bei 4°C in 30% Saccharoseelösung dehydriert. Die fixierten, dehydrierten Gehirne wurden in durch flüssigen Stickstoff gekühltem Propanol bei -60°C bis -80°C schockgefroren und auf Korkplättchen fixiert. Bis zur Weiterverarbeitung am Mikrotom lagerten die Gehirne bei -80°C im Gefrierschrank.

3.10 Gefriermikrotom

Mit einem Kryotom (Cryostat 1800, Reichert- Jung, Deutschland) wurden 40µm dicke, koronare Gehirnschnitte vom Mittelhirn angefertigt, orientierend am stereotaktischen Gehirnatlas (Paxinos et al., 2007). Die Schnitte wurden in Serie in Multiwell®-Zellkulturplatten in kryoprotektive Lösung überführt und lagerten bis zur histologischen Weiterverarbeitung bei -20°C im Gefrierschrank.

3.11 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Die folgenden Protokolle wurden immer an frei flottierenden Gehirnschnitten in Multiwell[®]-Platten durchgeführt. So bietet sich den Antikörpern, Lösungen und Seren eine größere Oberfläche als bei bereits aufgezogenen Schnitten (Kobelt et al., 2004). Die Arbeitsabläufe fanden bei 21°C statt, wenn nicht anders angegeben. PBS wurde stets in 0,1M Stoffmengenkonzentration verwendet. Spülvorgänge bestanden, wenn nicht anders angegeben, aus drei je fünfminütigen Spülschritten. Spül- und Inkubationsvorgänge wurden auf einer Schüttelplatte durchgeführt. Nach der immunhistochemischen Färbung wurden die Gehirnschnitte aus Aqua dest. auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet, in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert (70% Ethanol, 95% Ethanol, 2x Propanol, 2x Xylol) und in Entellan[®] (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Nach Immunfluoreszenzfärbung, Aufziehen der Schnitte aus Aqua dest. und Lufttrocknung erfolgte die Dehydrierung in Xylol und Eindeckung in Diazabizylo-oktan (DABCO, Sigma- Aldrich). Bis zur konfokalen Mikroskopie wurden die Objektträger bei – 20°C lichtgeschützt gelagert.

3.11.1 Immunhistochemie

3.11.1.1 BrdU- Färbung

Jeweils jeder sechste Schnitt eines Tieres wurde aus kryoprotektiver Lösung in PBS überführt und gespült. Zur Blockade endogener Peroxidasen erfolgte eine Inkubation in 0,6% Wasserstoffperoxid (H₂O₂)- Lösung für 30min. Nach erneuter Spülung wurden die Schnitte mit 2N HCl bei 37°C für 30min inkubiert, um die DNA zu denaturieren, dann für 10min in 0,1M Boratpufferlösung (pH 8,5) inkubiert und sechsmal gespült. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen und Blockierung geladener Oberflächenproteine führten wir eine 30 minütige Inkubation in tritonhaltiger Phosphatpufferlösung (PBS+) durch, bevor die Schnitte über Nacht bei 4°C mit anti- BrdU Antikörper (aus Ratte, 1:500, Biozol, Eching, Deutschland) in PBS+ inkubierten. Nach weiterem Spülvorgang wurden die Gehirnschnitte für 2h mit dem biotinylierten anti- Ratte Sekundärantikörper (1:500, Dianova, Hamburg, Deutschland) in PBS+ inkubiert. Erneuter Spülvorgang. Es folgte die Inkubation mit Avidin- Biotin- Komplex (9 µl/ml in PBS; ABC[®]-Reagenz, Vectastain Elite, Vector Laboratories, USA). Das tetramere Glykoproteins Avidin bietet die Möglichkeit der hochaffinen Bindung (10⁻¹⁵M) an vier Stellen an Biotin (Vitamin H oder B⁷) (Hsu et al., 1981). Eine dieser Bindungsstellen wird durch den biotinylierten

Antikörper besetzt. Die Weiteren können von biotinylierten Peroxidasen besetzt werden, wobei aus Gründen molekularer Konfigurationsänderung nicht alle Bindungsstellen besetzt werden. Dennoch führt die ABC- Methode zur Verstärkung des Signals bei der späteren Peroxidasereaktion und höherer Sensitivität im Vergleich zu anderen histochemischen Methoden (Bourne, 2000, Kayser et al., 1991). Nach nochmaligem Spülen wurde die Peroxidasereaktion ausgelöst. Hierbei reagierten Diaminobenzidin (0,25ml Stocklösung in PBS; DAB, Sigma-Aldrich) und Nickelammoniumsulfat (10µl 3%ig in 0,5ml Tris 1M; Sigma-Aldrich) mit der AB-Komplex gebundenen Peroxidase nach Zugabe von 6µl 30% H₂O₂ - Lösung. So wurden die anti- BrdU markierten Zellkerne dunkelbraun gefärbt. Abschließend erfolgte ein weiterer Spülvorgang.

3.11.1.2 Tyrosinhydroxylase (TH)- Färbung

Nach Überführen der Schnitte aus kryoprotektiver Lösung in PBS, Spülen, Blockade endogener Peroxidasen mit 0,6% H₂O₂-Lösung für 30min und erneutem Spülen, wurden die Inkubation mit dem Erstantikörper (anti-TH, 1:10.000, Maus, Sigma-Aldrich) über Nacht bei 4°C durchgeführt. Nach Spülen erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (anti- Maus, 1:1.000, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 2h, erneutes Spülen, Inkubation mit ABC[®]-Reagenz, Spülen und Chromogenreaktion mit DAB und Nickelammoniumchlorid (Sigma-Aldrich), wie bei der BrdU-Färbung (s.o).

3.11.2 Immunfluoreszenz

Jeweils jeder sechste Gehirnschnitt wurde mittels Immunfluoreszenz zwei-, oder dreifach gefärbt. Die Arbeitsschritte bestanden aus Überführen der Schnitte aus kryoprotektiver Lösung in PBS, Spülen, Inkubation mit 2N HCl bei 37°C für 30min zur Denaturierung der DNA, Boratpufferlösung 0,1 M (pH 8,5) für 10 min, sechsmal Spülen, Inkubation in PBS+ für 30 min, Inkubation der Primärantikörper in PBS+ über Nacht bei 4°C. Dann erneutes Spülen, Inkubation der Sekundärantikörper in PBS+ für 4h bei Dunkelheit und abschließendes Spülen.

Tabelle der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti- BrdU (Bromodesoxyuridin)	Ratte	1:500	Biozol
Anti- TH (Tyrosinhydroxylase)	Maus	1:10.000	Sigma- Aldrich
Anti- GFP (Green Fluorescent Protein)	Ziege	1:1000	APC Biermann Acris
Anti- GFP	Kaninchen	1:200	Abcam
Anti- iba1 (ionisiertes Calcium bindendes Adaptormolekül 1)	Kaninchen	1:1000	Wako
Anti- NG2 (neural/glial antigen 2)	Kaninchen	1:200	Chemicon
Anti- CNPase (2', 3'- Cyclische Nukleotid 3'- Phosphodiesterase)	Kaninchen	1:1000	Abcam
Anti- GFAP (glial fibrillary acid protein)	Meerschweinchen	1:500	Advanced ImmunoChemistry
Anti- DCX (Doublecortin)	Ziege	1:200	Santa Cruz Biotech.
Anti- S100β (S100 Calcium bindendes Protein β)	Maus	1:1000	Sigma- Aldrich
Anti- aktivierte Caspase3	Kaninchen	1:150	Abcam
Anti- vWF (van Willebrand Faktor)	Kaninchen	1:250	Abcam

Tabelle 2

Tabelle der verwendeten Sekundärantikörper:

Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller	Farbe
Anti- Ratte	RRX*	1:250	Dianova	rot
Anti- Kaninchen	FITC*	1:250	Dianova	grün
Anti- Ziege	FITC*	1:100	Dianova	grün
Anti- Kaninchen	Cy5*	1:250	Dianova	infrarot
Anti- Maus	Cy5*	1:250	Dianova	infrarot
Anti- Meerschweinchen	Cy5*	1:250	Dianova	infrarot
Anti- Ziege	Cy5*	1:500	Dianova	infrarot

Tabelle 3

*RRX= Rhodamin Red X, Absorptionsmaximum 550nm, Emissionsmaximum 570nm

*FITC= Fluorescein- Isothiocyanat, Absorptionsmax. 492nm, Emissionsmax. 520nm

*Cy5= Indodicarbocyanin 5, Absorptionsmax. 650nm, Emissionsmax. 674nm

3.12 Puffer und Lösungen

Phosphatpufferlösung (PBS) 0,1M, pH 7,4, pro l:

Aqua dest.

9g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)

29,1g Na₂HPO₄*12H₂O (Merck)

2,63g NaH₂PO₄*H₂O (Merck), Titration auf pH 7,4 mit 5N NaOH

Tris Puffer Lösung (TBS) pH 7,6

6,1g Tris- hydroxymethyl- aminomethan (Merck)

8,8g NaCl

37ml 1N HCl (Merck)

Boratpuffer 0,1M, pH 8,5, pro l:

Aqua dest.

6,16g Borsäure

Titration auf pH 8,5 mit 5N NaOH

PBS plus (PBS+), pro 100ml:

96ml PBS, 0,1 M

1ml Triton X-100 10% (Sigma- Aldrich)

3ml Eserserum (Chemicon, Schwalbach, Deutschland) oder Ziegenserum (Chemicon)

DAB- Stocklösung

50mg DAB, mit Aqua dest. auf 1ml auffüllen

4%ige Paraformaldehydlösung (PFA), pH 7,4, pro 2l:

PBS, 0,1M

Paraformaldehyd: 80 g (Sigma- Aldrich)

Kryoprotektive Lösung, pH 7,4, pro l:

500 ml PBS 0,1 M

250 ml Glycerin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

250 ml Ethylenglycol (Roth)

30%ige Saccharoselösung, pro l:

PBS 0,1M

300g Saccharose

3.13.1 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Untersuchung wurde an einem Leica LFSA Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) vorgenommen. Für eine Serie wurde jeweils jeder sechste koronare Schnitt der SN eines Tieres mikroskopiert. Bei einer Schichtdicke von 40µm ergab sich somit eine Entfernung zwischen den Schnitten von 240µm. Pro SN konnten so je 4 Schnitte bilateral ausgewertet werden. Die anatomischen Grenzen der SN wurden mit Hilfe eines Mäusegehirnatlasses (Paxinos et al., 2007) bestimmt. Zur Abgrenzung der SN wurde ein Objektiv mit 10- facher Vergrößerung verwendet. Die tatsächliche quantitative Auszählung der immunhistochemisch markierten Zellen erfolgte mittels eines Oelimmersionsobjektivs mit 40- facher Vergrößerung. Für eine halbautomatische stereologische Auswertung der immunhistochemisch markierten Zellen waren die Zellzahlen zu niedrig. Deswegen erfolgte die Auszählung manuell. Da jeder sechste koronare Schnitt der SN untersucht wurde, somit nur ein Sechstel der positiv gefärbten Zellen erfasst werden konnte, wurde die Zellzahl mit sechs multipliziert, um die tatsächliche Zellzahl der gesamten SN abzuschätzen. Die Ergebnisse der BrdU- positiven Zellen wurden jeweils in absoluten Zahlen angegeben.

3.13.2 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie bietet die Möglichkeit jede Ebene eines Präparats, und jeden emittierten Wellenlängenbereich einzeln zu erfassen. Das von Lasern erzeugte Anregungslicht tastet Schritt für Schritt Volumenelemente einer Ebene des Präparats ab, die emittierte Fluoreszenz der Antikörper- gekoppelten Chromogene wird durch eine Linse gebrochen und gelangt durch die Öffnung einer Lochblende zum Lichtdetektor. Anregungsebene und Detektionsebene sind dabei die Gleiche, Lichtemissionen aus anderen Ebenen werden unterdrückt. Der detektierte Lichtpunkt wird als Pixel auf dem Computerbildschirm dargestellt, durch Abtasten einer ganzen Ebene entsteht ein zweidimensionales Bild. Durch Untersuchung verschiedener Ebenen (Z- Schnittserien, Z-Stacks) entsteht ein dreidimensionales Bild. So wird die räumliche Zuordnung eines Chromogens zu einer Antikörper- markierten Zelle möglich und über Anregung und Detektion bestimmter Wellenlängen kann bestimmt werden, ob eine Kolokalisation der

unterschiedlichen Antikörper- gekoppelten Chromogene (hier RRX, FITC, Cy5) in einer Zelle besteht (für Übersicht zu konfokaler Mikroskopie, siehe Singh und Gopinathan, 1998).

Die Erfassung mittels doppelter-, oder dreifacher Immunfluoreszenz bearbeiteter Schnitte wurde an einem konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica DM 2500), mit vier „single photon solid-state Lasern“ mit Exzitationspunkten bei 405nm, 488nm, 532nm und 635nm, und Zeiss Axiovert 100 TV- Kamera (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Es wurde für eine Färbung, wie bei der Lichtmikroskopie (s. 3.13.1) beschrieben, jeder sechste koronare Schnitt der SN eines Tieres ausgewertet. Die anatomische Abgrenzung erfolgte ebenfalls wie unter 2.13.1 beschrieben. Die Auswertung wurde in Vergrößerung mit 40x und 63x Ölimmersionsobjektiven vorgenommen. Es wurden alle BrdU- positiven Zellen der SN eines Schnittes auf Kolokalisation mit anderen Markern (siehe Liste der Primär- und Sekundärantikörper) geprüft. Die erfassten Zellzahlen wurden zur Abschätzung der Gesamtzahl markierter Zellen in der SN mit sechs multipliziert. Die Bilder wurden im sequentiellen Modus aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Photoshop 7.0, dabei wurden ausschließlich Kontrast- und Helligkeitseinstellungen durchgeführt. Es erfolgte darüber hinaus keinerlei Manipulation der Bilder.

3.14 Statistische Analyse der Daten aus Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Alle Zellzahlen sind als arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean, SEM) angegeben. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 19[®] und Statview 5.0.1[®] ausgeführt. Für die statistischen Vergleiche wurden folgende Tests angewandt:

- 1.) Levene- Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen der Stichproben, bei Test auf Zwischensubjektfaktoren. Falls diese nicht gegeben war, wurden die Daten mittels Ziehen der Quadratwurzel transformiert.
- 2.) Zweifaktorielle Varianzanalyse (2-way ANOVA) mit Messwiederholungen auf einem Faktor, mit dem zweistufigen Zwischensubjektfaktor „Parkinsonmodell“ (MPTP vs Kontrolle) und dem vierstufigen Innersubjektfaktor „Zeitpunkte“ zum Vergleich der Unterschiede nigraler Zellzahlen über die vier Beobachtungszeitpunkte zwischen MPTP- und Kontrolltieren. Dabei wurde der Mauchly- Test auf Sphärizität der Stichproben durchgeführt. Falls die Annahme

der Sphärizität verletzt wurde, erfolgte eine Korrektur der Ergebnisse nach Greenhouse- Geisser.

- 3.) Zweifaktorielle Varianzanalyse (2-way ANOVA) mit den zweistufigen Faktoren „Parkinsonmodell“ (MPTP vs Kontrolle) und „L-Dopa- Behandlung“ (L-Dopa vs NaCl) zur Untersuchung der nigralen Zellzahlen nach 10-tägiger L-Dopa- , bzw NaCl- Behandlung.
- 4.) Dreifaktorielle Varianzanalyse (3-way ANOVA) mit Messwiederholungen auf einem Faktor, mit dem zweistufigen Zwischensubjektfaktor „Parkinsonmodell“ (MPTP vs Kontrolle), dem dreistufigen Faktor „physiologische Stimuli“ (STAN vs RUN vs ENR) und dem vierstufigen Innersubjektfaktor „Zeitpunkte“ zum Vergleich der Unterschiede nigraler Zellzahlen über die vier Beobachtungszeitpunkte zwischen MPTP- und Kontrolltieren bei Applikation von physiologischen Reizen. Dabei wurde der Mauchly- Test auf Sphärizität der Stichproben durchgeführt. Falls die Annahme der Sphärizität verletzt wurde, erfolgte eine Korrektur der Ergebnisse nach Greenhouse- Geisser.
- 5.) Dreifaktorielle Varianzanalyse (3-way ANOVA) mit den zweistufigen Faktoren „Parkinsonmodell“ (MPTP vs Kontrolle), „L-Dopa- Behandlung“ (L-Dopa vs NaCl) und dem dreistufigen Faktor „physiologische Stimuli“ (STAN vs RUN vs ENR) zur Untersuchung der nigralen Zellzahlen nach 10-tägiger L-Dopa-, bzw NaCl- Behandlung in unterschiedlichen Haltungsbedingungen.

Unterschiede wurden als signifikant erachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war. Zum Vergleich einzelner Gruppen innerhalb einer statistisch signifikanten ANOVA wurden a-posteriori t- Tests mit Adjustierung des α - Fehlerniveaus nach Bonferroni angewandt. Signifikante Innersubjekteffekte wurden mittels Test der Innersubjektkontraste analysiert. Die Graphiken wurden mit GraphPadPrism 5[®] und Microsoft Powerpoint[®] erstellt.

3.15 Zellkultur

In Kooperation mit Dr. med. Andreas Hermann und Prof. Dr. Alexander Storch, aus der Arbeitsgruppe „Neurodegeneration und Neuroregeneration“ der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden, erfolgte die Untersuchung des neurogenen Potentials der SN mittels Neurosphärenkultur.

Eine Neurosphäre ist dabei als nicht- adhärenter Cluster von Zellen zu verstehen, der aus neuronalen Vorläuferzellen hervorgehen ist (Hermey G, 2010).

Hierfür wurden 8-12 Wochen alte, weibliche, transgene pNestin- GFP C57BL/6 Mäuse (s. 3.2) in zwei Versuchstiergruppen eingeteilt (s. Tabelle 4). Die jeweiligen Behandlungen wurden wie bereits unter 3.3- 3.6 beschrieben, durchgeführt.

Versuchstiergruppen Neurosphärenkultur

Gruppe	Tieranzahl (n)	Behandlung (i.p.) Je 1x anTag 0-2	BrdU- Appl.	Stimulus	Tötung (Tage nach BrdU- Appl.)
Kontrolle STAN 10d	9	0,9% NaCl- Lsg.	Tag 0	Standard 10 Tage	10
MPTP STAN 10d	6	MPTP	Tag 0	Standard 10 Tage	10

Tabelle 4

Nach Transport der Tiere in die Räumlichkeiten der Arbeitsgruppe „Neurodegeneration und Neuroregeneration“ an der TU- Dresden am 10. Tag nach BrdU- Applikation, führten Dr. med. A. Hermann und Mitarbeiter dort die zellkulturelle Untersuchung durch. Diese erfolgte wie von Hermann et al. beschrieben (Hermann et al., 2006, 2009) in Anlehnung an das Protokoll von Bull und Bartlett (Bull und Bartlett, 2005) und wird im Folgenden kurz geschildert:

Die Mäuse wurden 10 Tage nach BrdU- Injektion mittels zervikaler Dislokation getötet, die Gehirne präpariert und in gekühlter, ausgewogener Salzlösung (Hank's balanced salt solution, HBSS) mit Zusatz von 1% Penicillin/ Streptomycin und 1% Glukose (alles von Gibco, Tulsa, USA) platziert. Die Gehirne wurden in ca. 500 µm dicke coronale Scheiben geschnitten und die Hirnregionen von Interesse wurden unter einem Dissektionsmikroskop aseptisch präpariert. Die drei gewählten Hirnregionen waren 1.) die laterale SVZ der Seitenventrikel 2.) die periventrikulären Regionen (PVR) des dritten Ventrikels (3V), des vierten Ventrikels (4V) und des Ductus Aquaticus (Aq) des Mittelhirnes, sowie 3.) die SN. Die SN wurde hierbei definiert, als das verbleibende

Mittelhirngewebe nach Entfernung von Zerebellum und ventrikulären Zonen um Aq, 3V und 4V. Das gewonnene Gewebe wurde mit dem Skalpell zerkleinert, in 0,1% Trypsin-Lösung (Sigma- Aldrich) für 10 min bei Raumtemperatur dispergiert, in DNase (40µg/ml; Sigma- Aldrich) für 10 min bei 37°C inkubiert und durch sanftes Triturieren zu einer quasi- Einzelzellschicht homogenisiert.

Es wurden Verdünnungsreihen durchgeführt, wobei die Zellen in absteigender Dichte in 96- Well Platten (BD Biosciences, Australia) mit je 200µl serumfreiem Neurobasalmedium mit 1% Glutamat, 2% B27 Supplement, 1% Penicillin/ Streptomycin (alles von Gibco), 20ng/ml Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2; Sigma) und 20ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor (EGF; Sigma) ausplattiert wurden. Die unterschiedlich verdünnten Zelllösungen wurden durch fortlaufende 1:2 Verdünnungen hergestellt, es ergaben sich Zelldichten von 5- 10.000 Zellen/Well. Es folgte die Expansion zu Neurosphären.

Nach Lefkovits und Waldmann (1984) geht eine positive Antwort (hier: Neurosphärenbildung) bei entsprechender Verdünnung auf mindestens eine Vorläuferzelle (hier: neuronale Vorläufer) zurück. Um eine Aussage über die Frequenz der Bildung von Neurosphären aus Vorläufern zu erhalten, wäre es am günstigsten die Verdünnung zu kennen, bei der exakt eine Vorläuferzelle pro Well platziert wurde, aus der dann jeweils Neurosphären entstehen. Da aber nicht differenziert werden kann, ob detektierte Neurosphären aus einer, oder mehreren Vorläufern hervorgegangen sind, kann nicht bestimmt werden, wie viele Vorläufer sich bei Neurosphärenbildung ursprünglich pro Well befanden. Nur bei negativer Antwort (keine Neurosphären/ Well) kann auf die Zahl der Vorläufer geschlossen werden, dann nämlich null. Würde eine Suspension mit 100 Vorläufern auf 100 Wells gleichmäßig verteilt werden, wären rechnerisch in 37 der Wells keine Vorläufer und in 63 ein, oder mehr Vorläufer. Dies kann vom Nullterm der Poisson'schen Verteilung abgeleitet werden:

$$F_0 = e^{-u}$$

wobei F_0 der Anteil negativer Antworten, e die Basis des natürlichen Logarithmus und u die Frequenz der positiven Antworten darstellt. Bei $u= 1$ ergibt sich

$$F_0 = e^{-1} = 1/e = 1/2.7 = 0.37 (=37\%)$$

Um die Frequenz potentiell neurosphärenbildender Zellen in der Zellkultur zu bestimmen, wurde daher nach 7 Tagen *in-vitro* der Anteil der Wells ohne Bildung von Neurosphären (negative Antwort) an der Gesamtzahl der Wells quantifiziert, dann logarithmisch transformiert und gegen die Zelldichte aufgetragen (Grenzverdünnungsanalyse nach Lefkovits und Waldmann, 1984). Mittels Origin 5.0[®] Software wurde eine lineare Regression durchgeführt und eine Gerade durch Null gelegt. Der Punkt auf dieser Geraden, an der der Anteil negativer Wells 37% beträgt, gibt auf der Abszisse die Zelldichte an, bei der die Zahl der Vorläufer pro Well eins ist. Zudem wurden die 95%- Konfidenzintervalle (95% KI) angegeben und graphisch dargestellt.

4. Ergebnisse

Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse gehen aus der mikroskopischen Auswertung der mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz bearbeiteten Gehirne der aufgeführten Tiergruppen (s. Methoden) hervor.

Zunächst werden die Auswirkungen von MPTP auf die dopaminergen (TH- positiven) nigralen Neurone gezeigt. Daraufhin folgt die quantitative Darstellung der nigralen Proliferation und Zellzahlentwicklung an den vier Untersuchungszeitpunkten. Dabei wird die Beeinflussung der Proliferation durch das MPTP- Parkinsonmodell wiedergegeben. Es wird die Wirkung von physiologischen Stimuli und L-Dopa Substitution, als weitere Einflussfaktoren auf die nigrale Proliferation und die einzelnen Subpopulationen aufgezeigt. Danach werden die mittels Immunreaktivität charakterisierten proliferierten Zellen nach Zellmarkern aufgeschlüsselt. Abschließend werden die Ergebnisse der zellkulturellen Untersuchung aufgeführt.

4.1 TH- positive Zellen

4.1.1 Einfluss des Parkinsonmodells auf TH- positive Zellen

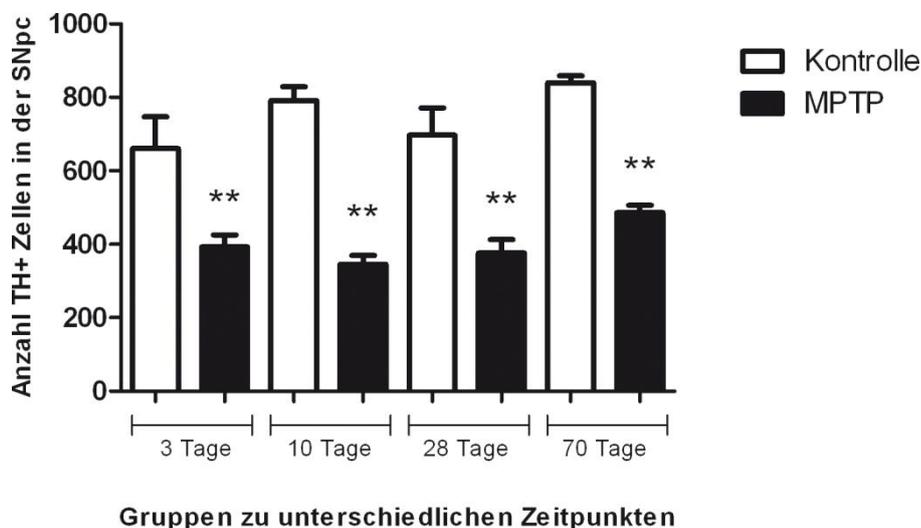


Abb. 4.1 zeigt den Vergleich der Zellzahlen (Mittelwert + Standardfehler) Tyrosinhydroxylase (TH)- positiver Zellen in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) in unterschiedlichen Versuchsgruppen ($n \geq 5$) zu den vier Untersuchungszeitpunkten. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Tage nach Versuchsbeginn. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholungen verglichen. Dabei war „Parkinsonmodell“ (MPTP versus Kontrolle) Zwischensubjektfaktor und „Zeitpunkte“ Innersubjektfaktor. * zeigt signifikante Unterschiede im Einzelvergleich der Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten mittels Bonferroni *post hoc* Tests ($*p < 0,05$, $**p < 0,001$) an.

Um die bekannte dopamindepletierende Wirkung von MPTP auf die SNpc zu beurteilen wurden die Tyrosinhydroxylase-positiven (TH+) Neurone quantifiziert. Da Tyrosinhydroxylase das Markerenzym für dopaminerge Neurone ist, wird im weiteren Verlauf „dopaminerg“ und „TH-positiv“ synonym verwendet. Die Daten geben die Zellzahlen der manuell, bilateral ausgezählten SNpc wieder. Es wurden die nigralen TH-positiven Zellen an den vier Untersuchungszeitpunkten (3, 10, 28, 70 Tage) bestimmt (**Abb. 4.1**). Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der detektierbaren nigralen dopaminergen Neurone in MPTP-behandelten Mäusen (MPTP) gegenüber gesunden Kontrollmäusen (Kontrolle) (2way ANOVA mit Messwiederholungen $F_{(1;8)}$: 48,8, $p < 0,001$). Die Verminderung der Zahl dopaminergen Zellen in MPTP-Tieren wurden durch *post-hoc* Tests verifiziert: nach 3 Tagen: Kontrolle 660 +/- 87, MPTP 393 +/-32 (Bonferroni *post hoc*: $p = 0,01$); nach 10 Tagen: Kontrolle 791 +/- 38, MPTP 345 +/-25 (Bonferroni *post hoc*: $p < 0,001$); nach 28 Tagen: Kontrolle 697 +/- 75, MPTP 376 +/-37 (Bonferroni *post hoc*: $p = 0,001$); nach 70 Tagen Kontrolle 840 +/- 19, MPTP 486 +/-20 (Bonferroni *post hoc*: $p < 0,001$) (**Abb. 4.1**). Der Faktor „Zeitpunkte“ (Innersubjekteffekt) war bei gegebener Sphärizität ($p = 0,73$) ebenfalls signifikant ($F_{(3;24)}$: 5,4, $p = 0,005$). Der signifikante lineare Innersubjektcontrast für „Zeitpunkte“ ($F_{(1;8)}$: 9,98, $p = 0,013$) zeigte, dass die Zahl dopaminergen Neurone über die Zeit zunahm. Der Interaktionseffekt (Parkinsonmodell x Zeitpunkte) war nicht signifikant ($F_{(1;3)}$: 2,6, $p = 0,07$). Durchschnittlich war die Zahl dopaminergen Neurone in MPTP-Tieren um 48,8 % (+/- 4,2%) vermindert.

4.1.2 Einfluss von L- Dopa und physiologischen Stimuli auf TH- positive Zellen

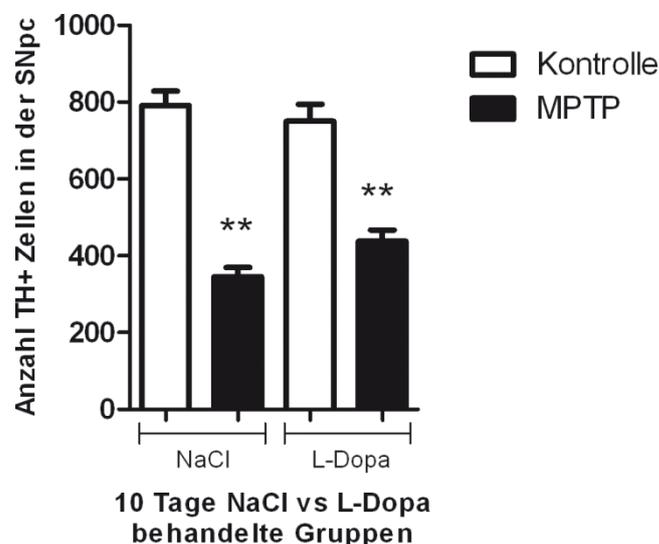


Abb. 4.2 zeigt die TH+ Zellzahlen der SNpc 10 Tage nach Versuchsbeginn bei L-Dopa-Behandlung und NaCl- Behandlung (0,9% NaCl-Lsg.) ($n \geq 5$). Statistische Analyse mittels zweifaktorieller ANOVA mit „Parkinsonmodell“ (MPTP vs. Kontrolle) und „L-Dopa- Behandlung“ (L-Dopa versus NaCl) als Faktoren. * zeigt signifikante Unterschiede im Einzelvergleich der Gruppen mittels Bonferroni *post hoc* Tests ($*p < 0,05$, $**p < 0,001$) an.

Eine zehntägige Behandlung ab Versuchsbeginn mit L-Dopa hatte weder in Kontrollmäusen, noch in MPTP- behandelten Mäusen einen Einfluss auf die Zahl der TH- exprimierenden Zellen (2way ANOVA $F_{(1;19)}: 0,595, p= 0,45$) Die Unterschiede durch MPTP bestanden weiterhin (2way ANOVA $F_{(3;19)}: 125,97, p < 0,001$) wie *post-hoc* Tests bestätigten: Kontrolle 791 +/- 38, MPTP 345 +/-25 (Bonferroni *post hoc*: $p < 0,001$), L-Dopa Kontrolle 750 +/- 44, L-Dopa MPTP 438 +/-29 (Bonferroni *post hoc*: $p < 0,001$, **Abb. 4.2**). Physiologische Stimuli (RUN und ENR) hatten keine Auswirkungen auf die dopaminergen Zellzahlen.

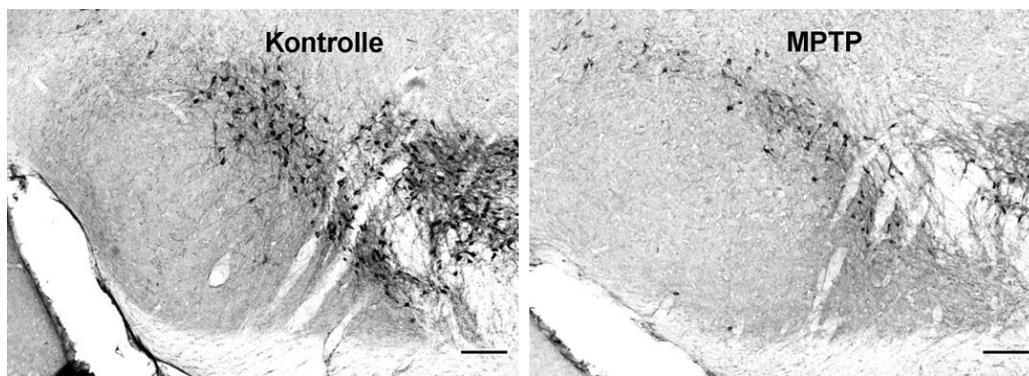


Abb. 4.3 zeigt exemplarisch lichtmikroskopische Aufnahmen von TH+/DAB Zellen in der SNpc eines Kontrolltiers (links) und eines MPTP- behandelten Tiers (rechts), jeweils 10 Tage nach Versuchsbeginn. Skala 100µm. Klaissle et al. 2012

4.2 BrdU- positive Zellen

4.2.1 Einfluss von MPTP auf BrdU- positive Zellen

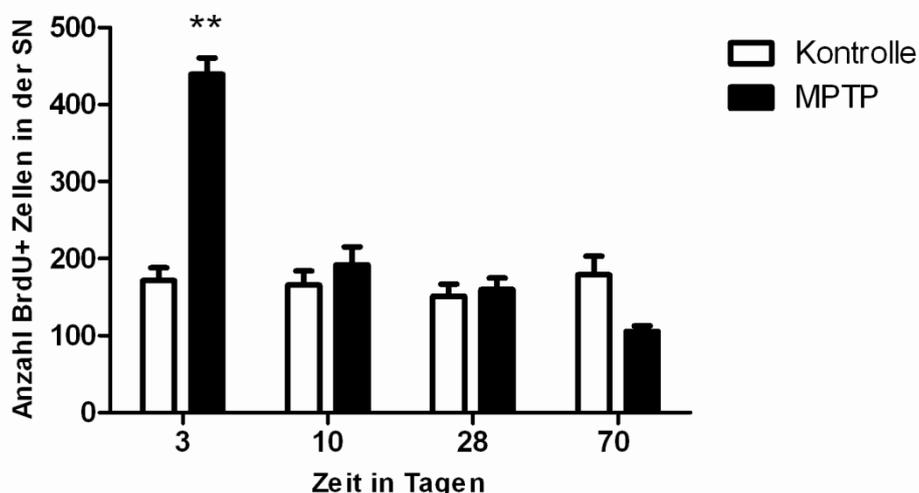


Abb. 4.4 zeigt die absoluten Zahlen BrdU-immunreaktiver (BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen ($n \geq 5$), über die vier Untersuchungszeitpunkte. Zeitangaben beziehen sich auf die Tage nach Versuchsbeginn. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholungen verglichen. Dabei war „Parkinsonmodell“ (MPTP versus Kontrolle) Zwischensubjektfaktor und „Zeitpunkt“ Innersubjektfaktor. * zeigt signifikante Unterschiede im Einzelvergleich der Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten mittels Bonferroni *post hoc* Tests ($*p < 0,05, **p < 0,001$) an.

Zur Untersuchung der Effekte von MPTP, bzw. einer Dopaminmangelsituation auf die Proliferation neuer Zellen und deren Überleben in der SN, wurde die Zahl der mittels des Proliferationsmarkers BrdU gekennzeichneten, neu gebildeten Zellen quantifiziert. Es zeigte sich ein signifikanter Effekt des Parkinsonmodells auf die Zahl nigraler, BrdU-markierter Zellen (2way ANOVA mit Messwiederholungen $F_{(1;8)}$: 16,6, $p < 0,001$). In der akuten Phase nach MPTP-Applikation drei Tage nach Versuchsbeginn, zeigte sich im MPTP-Modell eine erhöhte Zahl BrdU-positiver Zellen gegenüber der SN gesunder Vergleichstiere: Kontrolle 171.6 +/- 16.6, MPTP 439.2 +/- 21.3 (Bonferroni *post hoc*: $p < 0,001$). Derartige Unterschiede konnten nach 10, 28 und 70 Tagen nicht festgestellt werden. Die BrdU-Zellzahlen von Kontrolltieren entsprachen denen der MPTP-behandelten Tiere: Nach zehn Tagen: Kontrolle 165.6 +/- 18.3, MPTP 192 +/- 23.3 (Bonferroni *post hoc*: $p = 1,0$); nach 28 Tagen: Kontrolle 151.2 +/- 15.8, MPTP 163.5 +/- 19.2 (Bonferroni *post hoc*: $p = 1,0$); nach 70 Tagen: Kontrolle 178.8 +/- 24.5, MPTP 105.6 +/- 18.8 (Bonferroni *post hoc*: $p = 0,27$) (**Abb. 4.4**).

Der Innersubjekteffekt des Faktors „Zeitpunkte“ war bei gegebener Sphärizität ($p = 0,57$) hochsignifikant ($F_{(3;24)}$: 34,9, $p < 0,001$), ebenso wie der Interaktionseffekt (Parkinsonmodell x Zeitpunkte, $F_{(3;24)}$: 33,6, $p < 0,001$). Die signifikanten linearen und quadratischen Innersubjektkontraste für die Interaktion von Parkinsonmodell und Zeitpunkten (Linear: $F_{(1;8)}$: 71,7, $p < 0,001$, Quadratisch: $F_{(1;8)}$: 10,1, $p = 0,013$) zeigten, dass die Zahl neugeborener Zellen über die Zeit in MPTP-behandelten Versuchsgruppen abnahm, in Kontrollgruppen hingegen nicht. Die Abnahme war an den früheren Zeitpunkten stärker ausgeprägt als an den späteren (quadratischer Innersubjektcontrast signifikant). Am stärksten war die Verminderung zwischen 3 und 10 Tagen ($F_{(1;8)}$: 50,0, $p < 0,001$), aber auch zwischen 28 und 70 Tagen ($F_{(1;8)}$: 9,0, $p = 0,017$) war eine signifikante Abnahme festzustellen.

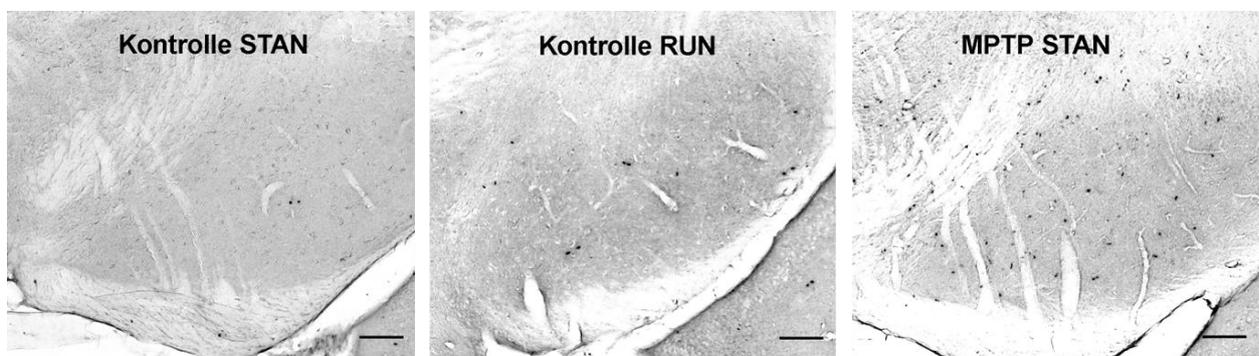


Abb. 4.5 zeigt exemplarisch lichtmikroskopische Aufnahmen von BrdU+/DAB Zellen in der SN eines Kontrolltiers und Standardbedingungen (links), eines Kontrolltiers im Laufradkäfig (mitte) und eines MPTP-behandelten Tiers unter Standardbedingungen (rechts), jeweils 3 Tage nach Versuchsbeginn. 100µm Skala. Klaissle et al. 2012

4.2.2

Einfluss von L- Dopa auf BrdU- positive Zellen

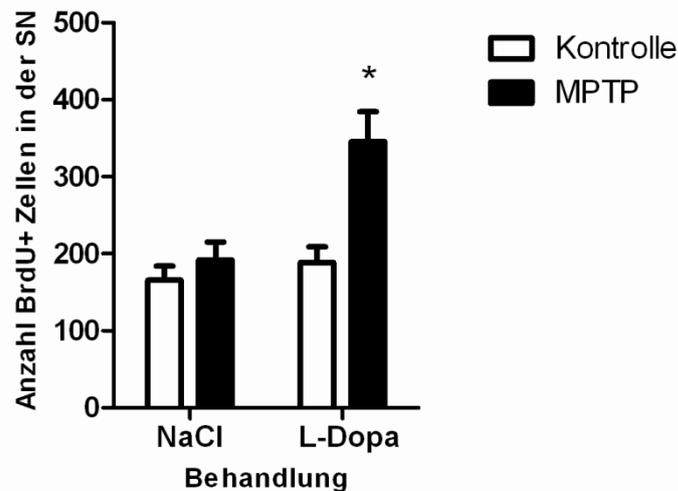


Abb. 4.6 zeigt die absoluten Zahlen BrdU-immunreaktiver (BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen ($n \geq 5$) 10 Tage nach Versuchsbeginn. Die Tiere wurden ab Versuchsbeginn entweder für 10 Tage mit L-Dopa oder NaCl (0,9% NaCl-Lsg) behandelt. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA verglichen. Dabei waren „Parkinsonmodell“ (MPTP versus Kontrolle) und Behandlung (L-Dopa versus NaCl) die Faktoren. * zeigt signifikante Unterschiede im Einzelvergleich der Gruppen mittels Bonferroni *post hoc* Tests (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$) an.

Bei der Analyse der Effekte der zehntägigen Behandlung mit L-Dopa auf MPTP- Mäuse und Kontrollen zeigten sich signifikante Haupteffekte für MPTP (2way ANOVA $F_{(1;16)}: 12,07, p = 0,003$) und L-Dopa (2way ANOVA $F_{(1;16)}: 11,14, p = 0,004$) auf die nigrale Zellproliferation. Auch ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen MPTP- und L-Dopa-Behandlung konnte nachgewiesen werden (2way ANOVA $F_{(1;16)}: 6,13, p = 0,025$). Demnach reagieren parkinsonoide Mäuse und gesunde Mäuse unterschiedlich auf L-Dopa- Gabe. L-Dopa erhöhte die nigrale Proliferation wenn die Tiere dem MPTP-Parkinsonmodell unterworfen waren. Die BrdU- positiven Zellen von Tieren, die parkinsonoid waren und L-Dopa erhielten, waren also erhöht gegenüber Tieren, die nur parkinsonoid waren (MPTP + NaCl $192 \pm 23,3$, MPTP + L-Dopa $345,6 \pm 38,6$, Bonferroni *post hoc*: $p = 0,001$), als auch erhöht gegenüber gesunden Kontrolltieren, die L-Dopa erhalten hatten (Kontrolle + L-Dopa $188,4 \pm 20,6$, MPTP + L-Dopa $345,6 \pm 38,6$, Bonferroni *post hoc*: $p = 0,001$) (**Abb 4.6**).

4.3 Typisierung proliferierter Zellen

Um den Zelltypus neugeborener Zellen identifizieren zu können, wurden sie mittels mehrfach- Immunfluoreszenz auf die Expression charakteristischer Zellmarker untersucht. Die konfokale Mikroskopie ermöglichte im Anschluss die räumliche Darstellung der immunreaktiven Zellen (s. Methoden). Bei Immunreaktivität für den Proliferationsmarker BrdU und Detektion eines weiteren Zellmarkers in derselben Zelle (Kokalisation), konnte auf den Typus der Zelle geschlossen werden, die im Untersuchungszeitraum mitotisch aktiv war. Hier erfolgte die Untersuchung auf Kokalisation mit BrdU von neuronalen (Nestin GFP)-, mikroglialen (Iba1) -, unreifen (S100 β) - und reifen (GFAP) astrozytären-, unreifen (NG2) und reifen (CNPase) oligodendrozytären, unreifen (DCX) und reifen (NeuN) neuronalen, sowie endothelialen (vWF, CD 31) Markern.

4.3.1 Keine Neurogenese in der SN

Es wurde bei der konfokalen Mikroskopie nie die Kokalisation von BrdU mit neuronalen Vorläufern oder Neuronen in der SN festgestellt. Auch astrozytäre Vorläufer, reife Astrozyten und Endothelzellen wurden in der SN nicht kolokalisiert mit BrdU vorgefunden. Somit konnte keine nigrale Neurogenese, keine Astrozytogenese und kein endothelialer Zellumsatz nachgewiesen werden.

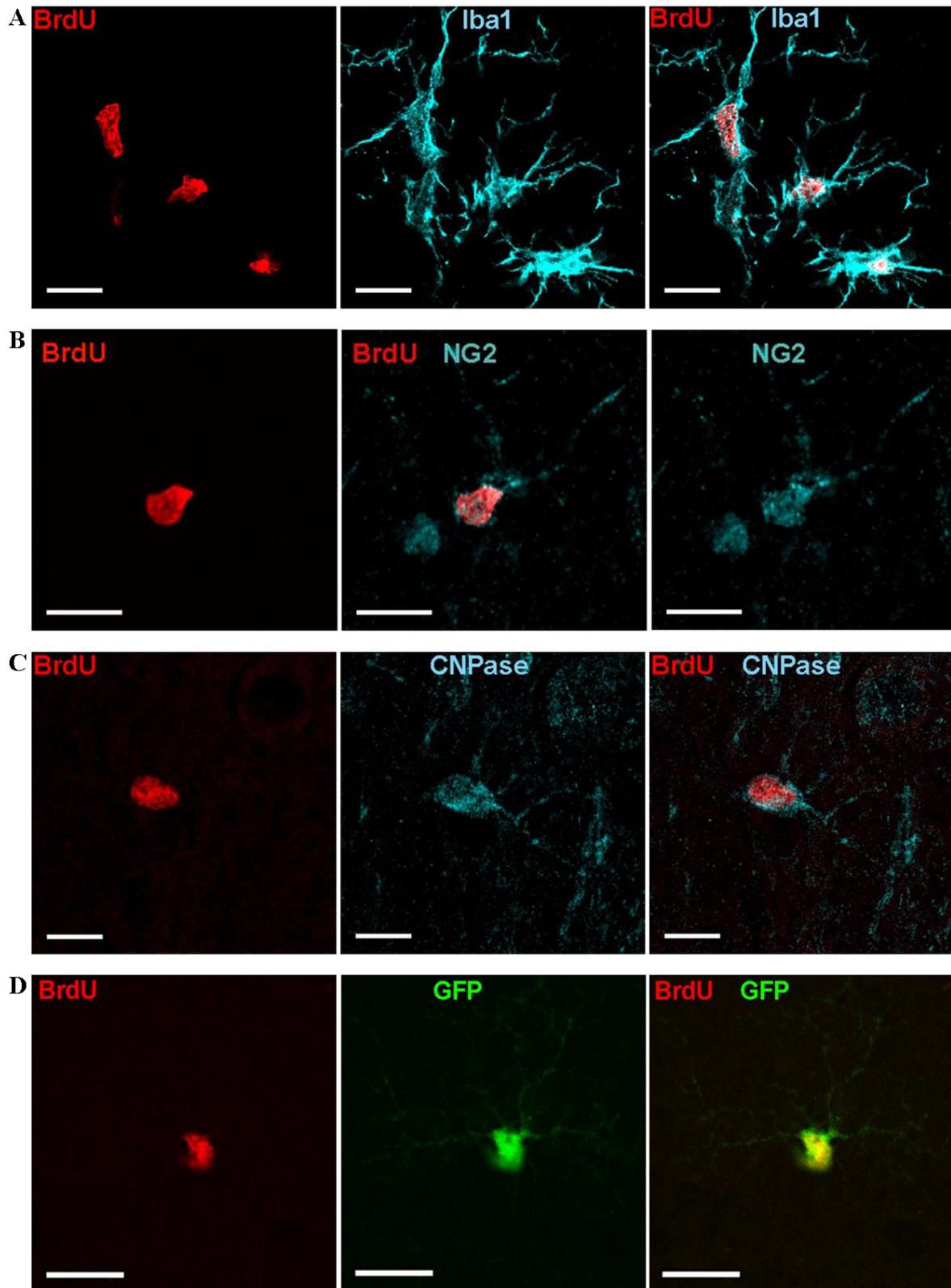


Abb. 4.7 zeigt exemplarisch konfokalmikroskopische Aufnahmen von Zellen in der SN. In der linken Bildreihe jeweils der BrdU- markierte Zellkern (rot), in der Mitte die Marker- positive Zelle (blau oder grün), rechts die Bilder übereinandergelegt. A) BrdU+ und Iba1+. B) BrdU+ und NG2+. C) BrdU+ und CNPase+ D) BrdU und GFP+. Skala jeweils 10µm.
Klaissle et al. 2012

4.3.2.1

Reaktive mikrogliale Proliferation in der SN in Folge von MPTP

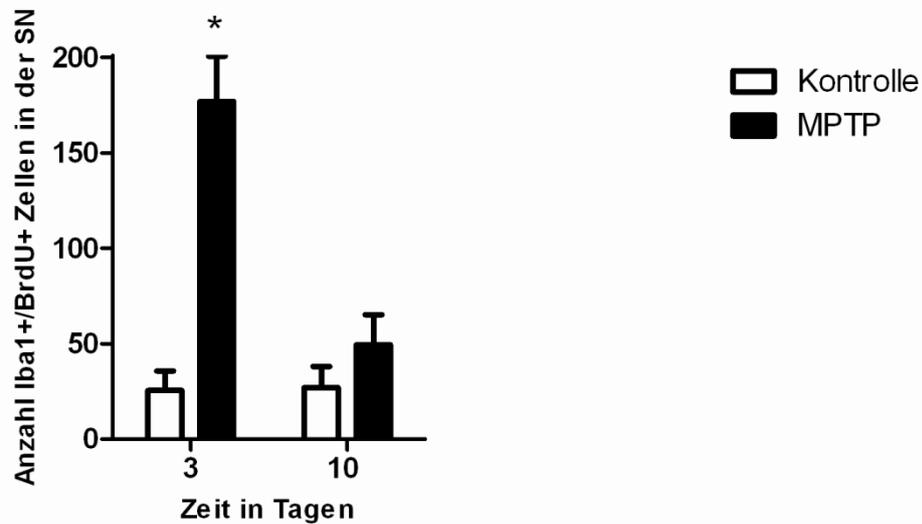


Abb. 4.8 zeigt die absoluten Zahlen Iba1- und BrdU-immunreaktiver (Iba1+/BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen ($n \geq 5$), über zwei Untersuchungszeitpunkte. Zeitangaben beziehen sich auf die Tage nach Versuchsbeginn. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholungen verglichen. Dabei war „Parkinsonmodell“ (MPTP versus Kontrolle) Zwischensubjektfaktor und „Zeitpunkt“ Innersubjektfaktor. * Zeigt signifikante Unterschiede im Einzelvergleich der Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten mittels Bonferroni *post hoc* Tests (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$) an.

Es zeigte sich ein signifikanter Effekt des Parkinsonmodells auf die Zahl nigraler neugeborener mikroglialer Zellen (2way ANOVA mit Messwiederholungen $F_{(1;6)}: 60,3$, $p < 0,0001$). Zum ersten Untersuchungszeitpunkt waren BrdU-positive (BrdU+) und gleichzeitig Iba1-positive (BrdU+/Iba1+) Zellen in MPTP-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht: Kontrolle $25,5 \pm 10,2$, MPTP $177 \pm 23,8$ (Bonferroni *post hoc*: $p = 0,001$). Die Zahl proliferierter Iba1-positiver Zellen war nach 10 Tagen in MPTP Tieren nicht mehr erhöht, die Unterschiede zu gesunden Kontrollen waren nicht signifikant: Kontrolle $27 \pm 11,1$, MPTP $49,5 \pm 15,8$ (Bonferroni *post hoc*: $p = 1,0$). Der Innersubjekteffekt der „Zeitpunkte“ war signifikant ($F_{(1;6)}: 10,0$, $p = 0,019$), ebenso wie der Interaktionseffekt (Parkinsonmodell x Zeitpunkte, $F_{(1;6)}: 10,5$, $p = 0,018$). Der signifikante lineare Innersubjektcontrast für die Interaktion von Parkinsonmodell und Zeitpunkten ($F_{(1;6)}: 10,5$, $p = 0,018$) zeigte, dass die Zahl neugeborener mikroglialer Zellen über die Zeit in MPTP-behandelten Versuchsgruppen abnahm, in Kontrollgruppen hingegen nicht (**Abb. 4.8**).

Zu späteren Zeitpunkten, nach 28 und 70 Tagen, konnten bezüglich BrdU+/Iba1+ Zellen keine Unterschiede mehr zwischen MPTP-Mäusen und Kontrollmäusen festgestellt werden. Der relative Anteil BrdU+/Iba1+ Zellen an allen BrdU+ Zellen in MPTP-Tieren nahm von ca. 40% am 3.Tag, über 26% am 10. Tag und 15% am 28. Tag ab. In

Kontrollen, die statt MPTP physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten, betrug der Anteil mitotisch aktiver mikroglialer Zellen an allen mitotisch aktiven Zellen zu allen Versuchszeitpunkten zwischen 8- und 15%.

4.3.2.2 L- Dopa hat keinen Einfluss auf nigrale mikrogliale Proliferation

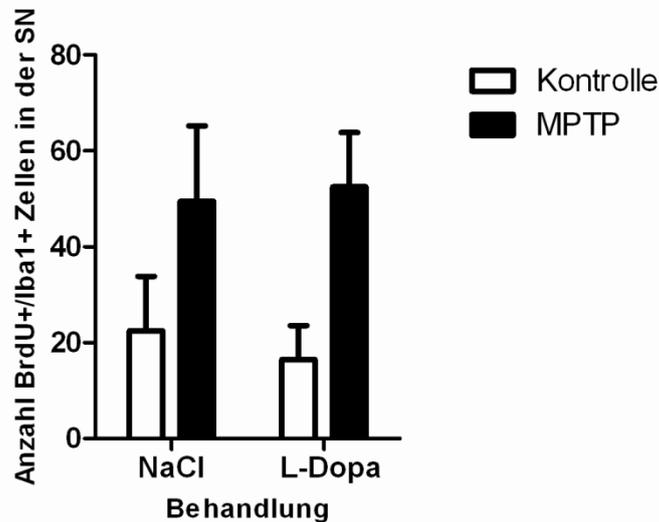


Abb. 4.9 zeigt die absoluten Zahlen Iba1- und BrdU-immunreaktiver (Iba1+/BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen ($n \geq 5$) 10 Tage nach Versuchsbeginn. Die Tiere wurden ab Versuchsbeginn entweder für 10 Tage mit L-Dopa oder NaCl (0,9% NaCl-Lsg) behandelt. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA verglichen. Dabei waren „Parkinsonmodell“ (MPTP versus Kontrolle) und Behandlung (L-Dopa versus NaCl) die Faktoren.

Die zehntägige Behandlung der MPTP- Mäuse und Kontrollen mit L-Dopa beeinflusste die mikrogliale Proliferation in der SN nicht. So zeigten sich weder signifikanten Effekte der L-Dopa Behandlung (2way ANOVA $F_{(1;12)} 0.1$, $p=0.76$), noch Interaktionseffekte zwischen L-Dopa und MPTP (2way ANOVA $F_{(1;12)} 0.33$, $p=0.58$). Einzig der Effekt von MPTP bezüglich der Zahl Iba1- und BrdU- positiver Zellen war schwach signifikant (2way ANOVA $F_{(1;12)} 6.23$, $p=0.028$). *Post- hoc* Tests zwischen den einzelnen Gruppen ergaben keine Signifikanzen: NaCl +Kontrolle 27 +/- 11.1, NaCl+ MPTP 49.5 +/- 15.8 (Bonferroni *post hoc*: $p= 0,2$), Kontrolle + L-Dopa 16.5 +/- 7.1, MPTP + L-Dopa 52.5 +/- 11.3 (Bonferroni *post hoc*: $p= 0,304$).

4.3.3.1 Die Zahl NG2-positiver oligodendrozytärer Vorläuferzellen nimmt über die Zeit ab



Abb. 4.10 zeigt die absoluten Zahlen NG2- und BrdU- immunreaktiver (NG2+/BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen ($n \geq 5$) über die vier Untersuchungszeitpunkte. Zeitangaben beziehen sich auf die Tage nach Versuchsbeginn. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholungen verglichen. Dabei war „Parkinsonmodell“ (MPTP versus Kontrolle) Zwischensubjektfaktor und „Zeitpunkt“ Innersubjektfaktor.

Es zeigte sich kein signifikanter Effekt des Parkinsonmodells auf die Zahl neugeborener, NG2- markierter Zellen (2way ANOVA mit Messwiederholungen $F_{(1;7)}: 1,76$, $p= 0,22$) in der SN. Der Innersubjekteffekt des Faktors „Zeitpunkte“ war, bei gegebener Sphärizität ($p= 0,118$), signifikant ($F_{(3;21)}: 9,7$, $p < 0,001$). Der Interaktionseffekt war nicht signifikant (Parkinsonmodell x Zeitpunkte, $F_{(3;21)}: 1,1$, $p= 0,362$). Ein signifikanter linearer Innersubjektcontrast für die Zeitpunkte ($F_{(1;7)}: 27,7$, $p= 0,001$, Quadratisch: $F_{(1;8)}: 10,1$, $p= 0,013$), bei nicht signifikanter Interaktion, zeigte, dass die Zahl neugeborener oligodendrozytärer Vorläufer über die Zeit sowohl in MPTP- behandelten Versuchsgruppen, als auch in Kontrollgruppen linear abnahm. Zu den früheren Untersuchungszeitpunkten, drei und zehn Tage nach BrdU- Gabe waren 46- 65% aller BrdU- markierter Zellen NG2- positiv. Dieser Anteil war nach 70 Tagen auf 13% reduziert (**Abb. 4.13**).

4.3.3.2

Oligodendrozytäre Präkursoren (OPCs) sind suszeptibel für L-Dopa bei vorheriger Dopamindepletion

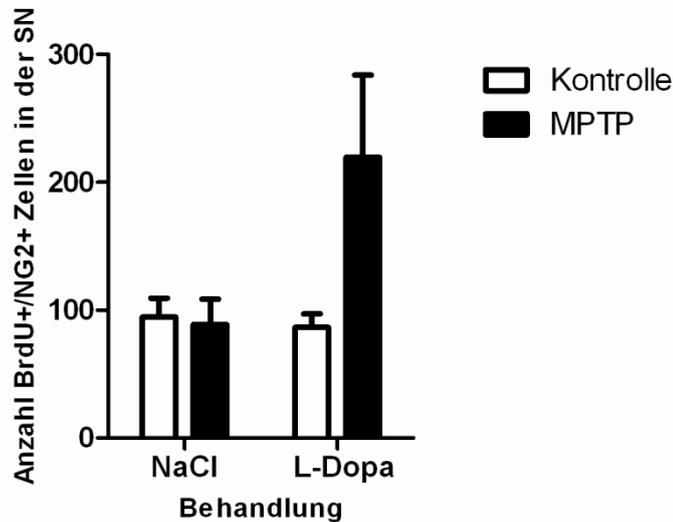


Abb. 4.11 zeigt die absoluten Zahlen NG2- und BrdU-immunreaktiver (NG2+/BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen ($n \geq 5$) 10 Tage nach Versuchsbeginn. Die Tiere wurden ab Versuchsbeginn entweder für 10 Tage mit L-Dopa oder NaCl (0,9% NaCl-Lsg) behandelt. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA verglichen. Dabei waren „Parkinsonmodell“ (MPTP versus Kontrolle) und Behandlung (L-Dopa versus NaCl) die Faktoren.

Die Effekte der zehntägigen Behandlung der MPTP- Mäuse und Kontrollen mit L-Dopa auf oligodendrozytäre Vorläufer wurde mit einer zweifaktoriellen ANOVA analysiert. Zwar zeigten sich keine signifikanten Haupteffekte für MPTP (2way ANOVA $F_{(1;13)} 4,05$, $p= 0,065$) und L-Dopa (2way ANOVA $F_{(1;13)} 3,5$, $p= 0,084$) auf die OPC-Zellproliferation. Jedoch war der Interaktionseffekt zwischen L-Dopa und MPTP bezüglich der Zahl NG2- und BrdU- positiver Zellen signifikant (2way ANOVA $F_{(1;13)} 5,6$, $p= 0,034$). Nigrale NG2- und BrdU- positive Zellen reagierten demnach unterschiedlich auf L- Dopa, abhängig davon ob es sich um gesunde Tiere, oder MPTP behandelte Tiere handelte. Die konservativen Bonferroni *post- hoc* Tests zeigten zwar keine Signifikanzen, aber den Trend, dass mehr NG2+/BrdU+ Zellen detektiert wurden, wenn L- Dopa behandelte Tiere zuvor dem MPTP- Parkinsonmodell zugeordnet worden waren (Kontrolle + L-Dopa $86,5 \pm 10,7$, MPTP + L-Dopa $156 \pm 12,3$ Bonferroni *post hoc*: $p= 0,059$). Ebenso, wenn Tiere, die dopamindepletiert waren und L-Dopa erhielten mit Tieren, die nur parkinsonoid waren verglichen wurden (MPTP + NaCl $192 \pm 23,3$, MPTP + L-Dopa $345,6 \pm 38,6$, Bonferroni *post hoc*: $p= 0,053$) (**Abb. 4.11**).

4.3.4.1 Oligodendrogenese in der adulten SN wird durch MPTP inhibiert

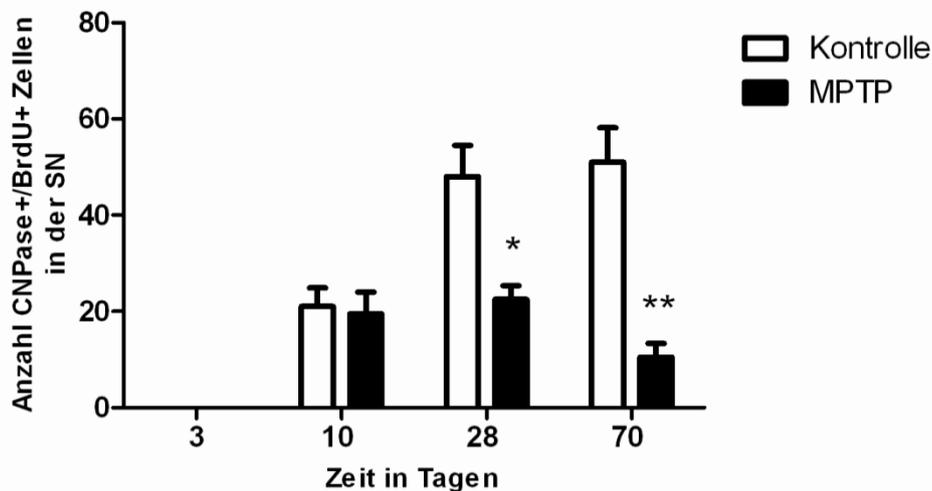


Abb. 4.12 zeigt die absoluten Zahlen CNPase- und BrdU-immunreaktiver (CNPase+/BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen ($n \geq 5$) über die vier Untersuchungszeitpunkte. Zeitangaben beziehen sich auf die Tage nach Versuchsbeginn. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholungen verglichen. Dabei war „Parkinsonmodell“ (MPTP versus Kontrolle) Zwischensubjektfaktor und „Zeitpunkt“ Innersubjektfaktor. * zeigt signifikante Unterschiede im Einzelvergleich der Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten mittels Bonferroni *post hoc* Tests ($*p < 0,05$, $**p < 0,001$) an.

Um zu überprüfen, ob die Abnahme des Markers für oligodendrozytäre Vorläufer mit einer Zunahme des Markers für reife Oligodendrozyten einhergeht, wurde die Kolo-kalisation von BrdU und CNPase untersucht.

Nach drei Tagen war keine Kolo-kalisation von BrdU und CNPase detektierbar. Aber nach zehn Tagen stellten sich Zellen mit Immunreaktivität für BrdU- und CNPase in der SN dar. Es zeigte sich ein signifikanter Effekt des Parkinsonmodells auf die Zahl der im Untersuchungszeitraum proliferierten, CNPase- markierten Zellen (2way ANOVA mit Messwiederholungen $F_{(1;6)}: 32,5, p = 0,001$) in der SN.

Mit Hilfe von *post- hoc* Tests wurde ersichtlich, dass die Zahl proliferierter, reifer Oligodendrozyten nach 10 Tagen in MPTP- behandelten Gruppen und Versuchsgruppen gleich war: Kontrolle 21 +/- 3,9, MPTP 19,5 +/- 4,5, Bonferroni *post hoc*: $p = 1,0$). Nach 28 Tagen war die Zahl BrdU- positiver-, plus CNPase-positiver Zellen in MPTP- Gruppen gegenüber Kontrollen signifikant vermindert (Kontrolle 48 +/- 6,5, MPTP 22,5 +/- 2,9 Bonferroni *post hoc*: $p = 0,026$), nach 70 Tagen war dieser Unterschied in der Zahl BrdU-positiver, reifer Oligodendrozyten zwischen MPTP- Tieren und Kontrolltieren noch ausgeprägter (Kontrolle 51 +/- 7,1, MPTP 10,5 +/- 2,9, Bonferroni *post hoc*: $p < 0,001$) (**Abb. 4.12**). Der Innersubjekteffekt des Faktors „Zeitpunkte“ war, bei gegebener Sphärizität ($p = 0,73$), signifikant ($F_{(2;12)}: 4,8 p = 0,029$),

ebenso wie der Interaktionseffekt (Parkinsonmodell x Zeitpunkte, $F_{(12)}: 7,9, p= 0.006$). Der signifikante lineare Innersubjektcontrast für die Interaktion von Parkinsonmodell und Zeitpunkten ($F_{(1;6)}: 14,5, p= 0,009$) zeigte, dass die Zahl neugeborener, reifer Oligodendrozyten über die Zeit in Kontrollgruppen zunahm. In MPTP- behandelten Gruppen gab es keine signifikante Veränderung über die Zeit ($F_{(2;6)}: 2,8, p= 0,139$).

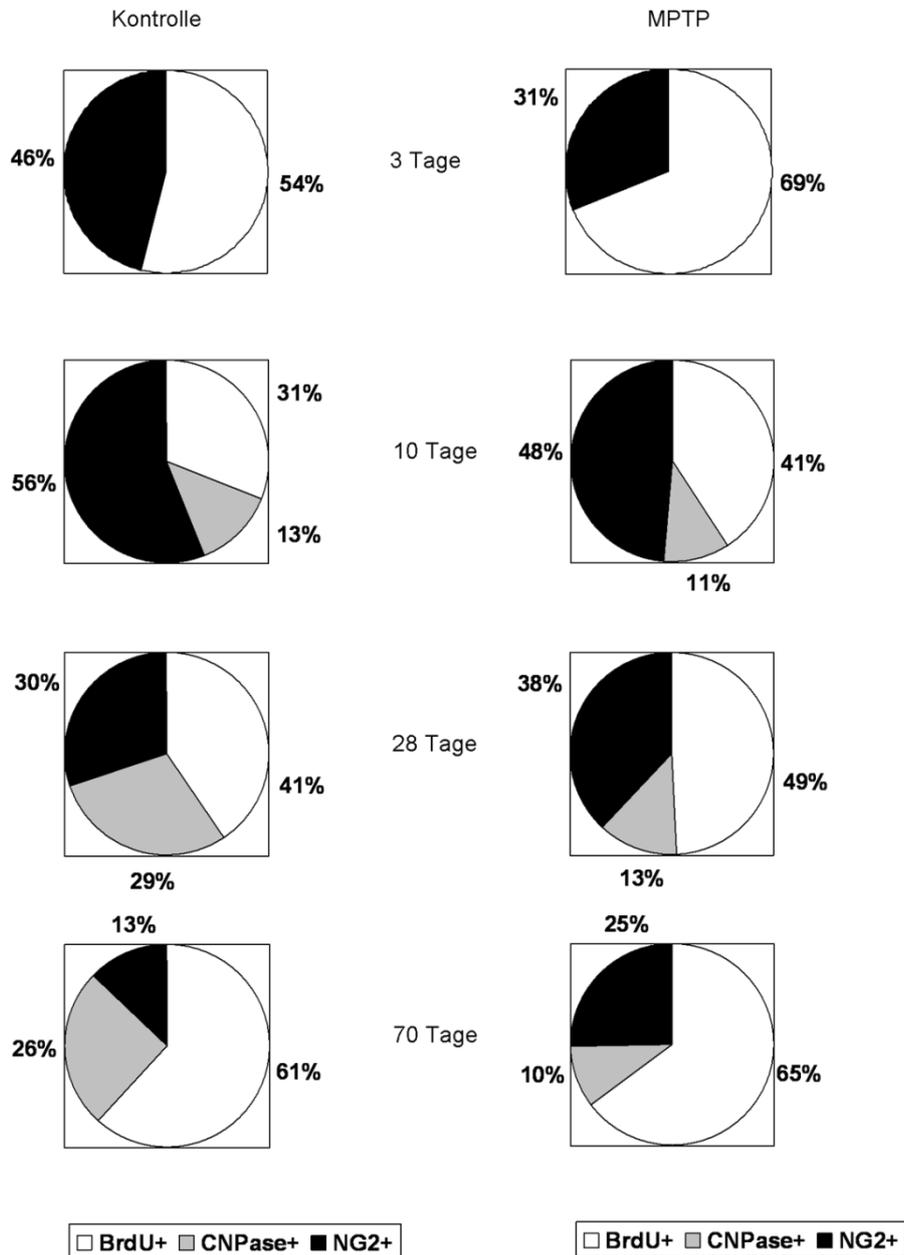


Abb. 4.13 zeigt den relativen Anteil NG2- plus BrdU- positiven Zellen, CNPase- plus BrdU- positiven und nur BrdU- positiven Zellen an allen BrdU- positiven Zellen in der SN von Kontrollgruppen (links) und MPTP- Gruppen (rechts) an den vier Untersuchungszeitpunkten. Zeitangaben beziehen sich auf die Tage nach Versuchsbeginn.

Der Anteil CNPase- positiver Zellen an allen BrdU- positiven Zellen in gesunden Kontrollen betrug nach 10 Tagen ca. 13%, erhöhte sich nach 28 Tagen auf ca. 29% und blieb auch nach 70 Tagen in etwa auf demselben Niveau, mit ca. 26%.

In MPTP- behandelten Tieren blieb der prozentuale Anteil CNPase- positiver Zellen zu späteren Zeitpunkten auf unverändert niedrigem Niveau. Nach 10 Tagen waren es 11%, nach 28 Tagen 13% und nach 70 Tagen 10% (**Abb. 4.13**). Eine Koexpression von NG2 und CNPase in derselben Zelle war nie zu finden.

4.3.4.2 Inhibierte Oligodendrogenese in der adulten SN durch MPTP wird durch L-Dopa nicht beeinflusst

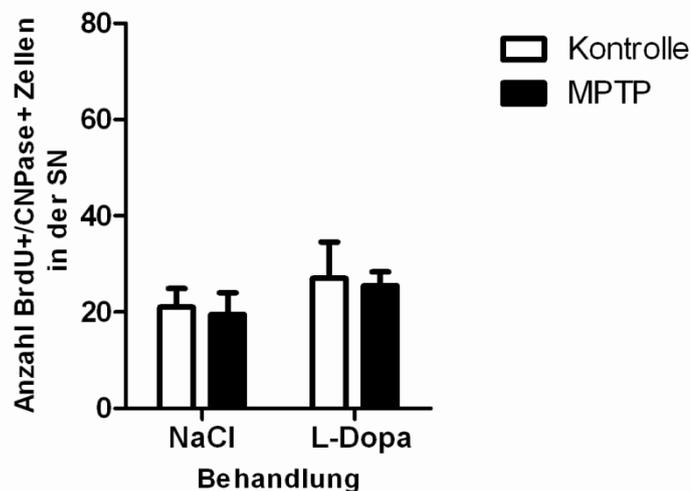


Abb. 4.14 zeigt die absoluten Zahlen CNPase- und BrdU-immunreaktiver (CNPase+/BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen ($n \geq 5$) 10 Tage nach Versuchsbeginn. Die Tiere wurden ab Versuchsbeginn entweder für 10 Tage mit L-Dopa oder mit NaCl (0,9% NaCl-Lsg.) behandelt. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA verglichen. Dabei waren „Parkinsonmodell“ (MPTP versus .Kontrolle) und Behandlung (L-Dopa versus NaCl) die Faktoren.

Die zehntägige Behandlung der MPTP- Mäuse und Kontrollen mit L-Dopa beeinflusste die Bildung reifer Oligodentroyten in der SN nicht. Es zeigte sich weder ein signifikanter Effekt für die L- Dopa Behandlung (2way ANOVA $F_{(1;12)} 1.43$ $p= 0.254$), noch für das Parkinsonmodell (2way ANOVA $F_{(1;12)} 1.43$ $p= 0.77$). Auch der Interaktionseffekt (Parkinsonmodell x L-Dopa Behandlung) war nicht signifikant (2way ANOVA $F_{(1;12)} 0,0$ $p= 1,0$).

4.3.5.1 Nestin-positive neurale Vorläufer werden nur vorübergehend von MPTP beeinflusst

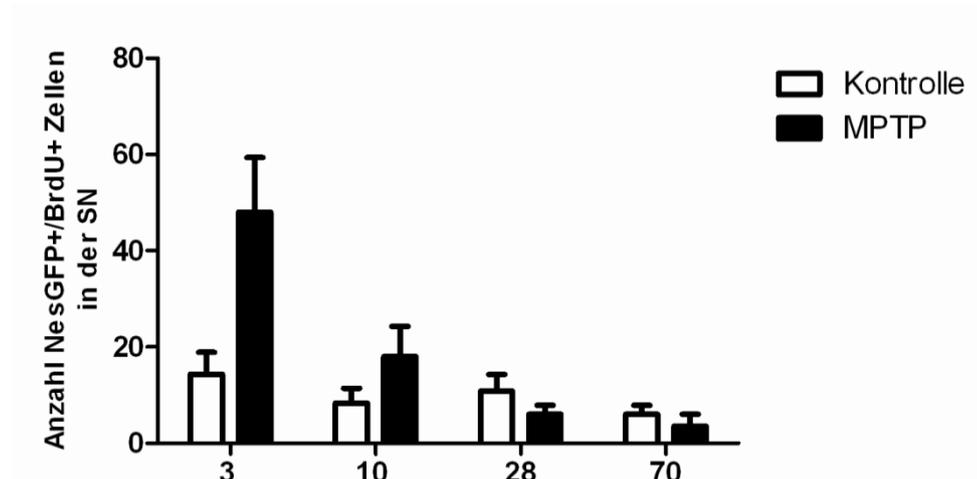


Abb. 4.15 zeigt die absoluten Zahlen Nestin-GFP- und BrdU-immunreaktiver (NesGFP+/BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen ($n \geq 5$) über die vier Untersuchungszeitpunkte. Zeitangaben beziehen sich auf die Tage nach Versuchsbeginn. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholungen verglichen. Dabei war „Parkinsonmodell“ (MPTP versus Kontrolle) Zwischensubjektfaktor und „Zeitpunkt“ Innersubjektfaktor.

Der Effekt des Parkinsonmodells auf die Zahl mitotisch aktiver, früher neuronaler Vorläufer in der SN, gekennzeichnet durch Nestin- GFP- Immunreaktivität bei gleichzeitiger BrdU- Markierung, war nicht signifikant (2way ANOVA mit Messwiederholungen $F_{(1;8)}: 3,36, p= 0,104$).

Der Innersubjekteffekt des Faktors „Zeitpunkte“ war signifikant ($F_{(1,637;13,094)}: 12,7, p= 0,001$). Da die Sphärizität, entsprechend dem Mauchly- Test, nicht gegeben war ($p = 0,24$), wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit p nach Greenhouse- Geisser korrigiert.

Der Interaktionseffekt war ebenfalls signifikant (Parkinsonmodell x Zeitpunkte, $F_{(1,637;13,094)}: 7,3 p= 0,01$, nach Greenhouse -Geisser korrigiert).

Ein signifikanter linearer Innersubjektkontrast für die Interaktion von Parkinsonmodell und Zeitpunkten ($F_{(1;8)}: 13,6, p= 0.006$) ergab, dass die Zahl BrdU-markierter, neuronaler Vorläufer über die Zeit in MPTP- behandelten Versuchsgruppen linear abnahm.

Der Anteil Nestin-GFP- positiver neuronaler Vorläuferzellen an allen BrdU- markierten Zellen war zu allen Zeitpunkten klein. Er verminderte sich von 8,5- 11,6 % am 3. Tag nach Versuchsbeginn, bis auf 1,5- 2% am 70. Tag nach Versuchsbeginn.

Zu allen Untersuchungszeitpunkten war etwa die Hälfte der Nestin-GFP- positiven/ BrdU- positiven Zellen gleichzeitig immunreaktiv für NG2. Dies war sowohl in gesunden Tieren, als auch in MPTP- Tieren der Fall. Aufgrund der niedrigen Zellzahlen dieser nigralen Subpopulation konnte jedoch keine statistische Auswertung erfolgen. Es fand sich bei BrdU- positiven Zellen keine Koexpression von Nestin-GFP mit Iba1, CNPase, oder sonstigen reifen oder unreifen astrozytären oder neuronalen Markern.

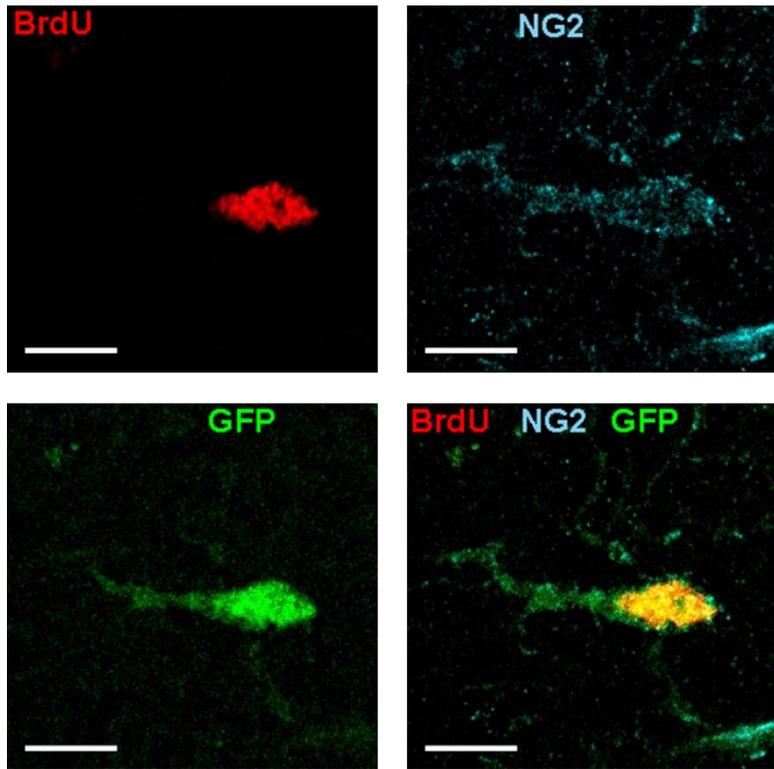


Abb. 4.16 zeigt exemplarisch konfokalmikroskopische Aufnahmen einer Marker-positiven Zelle in der SN. Oben links der BrdU-markierte Zellkern (rot), oben rechts dieselbe Zelle NG2-positiv (blau), unten links GFP-positiv (grün) und unten rechts die Bilder übereinandergelegt. Skala jeweils 10µm. Klaisle et al. 2012

4.3.5.2

Nestin- positive Zellen werden nicht von L- Dopa beeinflusst

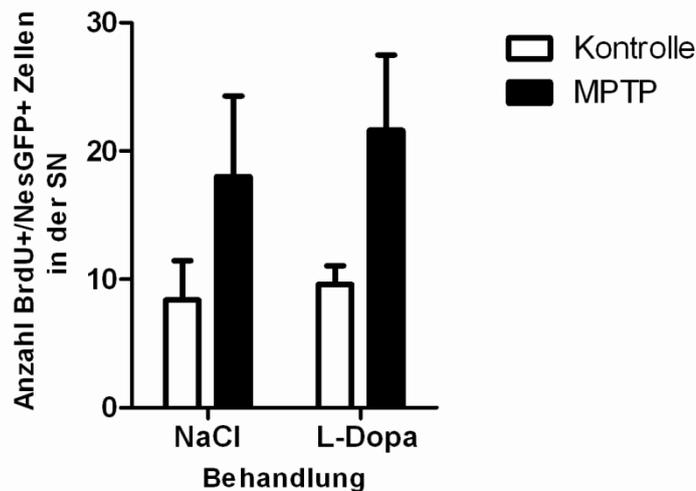


Abb. 4.17 zeigt die absoluten Zahlen Nestin-GFP- und BrdU-immunreaktiver (NesGFP+/BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen ($n \geq 5$) 10 Tage nach Versuchsbeginn. Die Tiere wurden ab Versuchsbeginn entweder für 10 Tage mit L-Dopa oder NaCl (0,9% NaCl-Lsg) behandelt. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA verglichen. Dabei waren „Parkinsonmodell“ (MPTP versus Kontrolle) und Behandlung (L-Dopa versus NaCl) die Faktoren.

Die zehntägigen Behandlung der MPTP- Mäuse und Kontrollen mit L-Dopa beeinflusste die Bildung Nestin-positiver Zellen in der SN nicht (2way ANOVA $F_{(1;16)} 0.27$, $p = 0,61$). MPTP erhöhte die Zahl BrdU- markierter neuraler Vorläufer unabhängig von der Behandlung mit L-Dopa ($F_{(1;16)} 5,5$ $p = 0,033$; Interaktionseffekt Parkinsonmodell x L-Dopa Behandlung: $F_{(1;16)} 0,067$, $p = 0,799$). Bonferroni *post-hoc* Vergleiche der einzelnen Gruppen ergaben keine signifikanten Unterschiede (Kontrolle+ NaCl 8,4 +/- 3,1, MPTP+ NaCl 18 +/- 6,3 (Bonferroni *post hoc*: $p = 0,971$); Kontrolle+ L-Dopa 9,6 +/- 1,5, MPTP + L-Dopa 21,6 +/- 5,9 (Bonferroni *post hoc*: $p = 0,512$)).

4.3.6

Ein Teil der proliferierten Zellen der SN ist nicht immunotypisierbar

Es wurden zu allen Zeitpunkten Zellen mit BrdU markiert, die keine Immunreaktivität für irgendwelche der genutzten Zellmarker zeigten. Diese nicht immunotypisierbaren Zellen fanden sich sowohl in MPTP behandelten Tieren, wie auch in gesunden Kontrolltieren zu etwa gleichen Anteilen. Dieser Anteil BrdU- positiver Zellen betrug nach 3 Tagen ca. 15-30%, nach 10 Tagen 10- 15%, nach 28 Tagen ca. 10-35% und nach 70 Tagen ca. 55-70%.

Bei der Apoptose verlieren untergehende Zellen die Expression cytoplasmatischer und membranöser Antigene, bevor es zum Abbau des Kerns und der dortigen DNA kommt. Es ist daher möglich, dass apoptotische Zellen noch Immunreaktivität für das nukleär

lokalisierte BrdU zeigen, aber nicht für charakteristische cytoplasmatische Antigene, die nicht mehr intakt sind. Die Antigene, gegen welche die hier als Marker genutzten Antikörper gerichtet waren, sind cytoplasmatisch und/oder membranös lokalisiert.

Um zu untersuchen, ob es sich bei den ausschließlich BrdU- positiven Zellen um in der Apoptose befindliche Zellen handelte, wurden sie daher auf Immunreaktivität des Apoptosemarker anti- aktivierte Caspase 3 überprüft. Als Effektorcaspase, die zelluläre Proteine spaltet, ist Caspase 3 wichtiger Teil des apoptotischen Signalwegs und wird in der späten Phase der Apoptose aktiviert (Nakajima et al., 2001)

In der SN fanden sich zu allen Untersuchungszeitpunkten nur sehr vereinzelt BrdU- markierte Zellen, die auch immunopositiv für Caspase 3 waren (siehe **Abb. 4.18**). Es waren zu wenige, als dass eine statistische Auswertung hätte erfolgen können.

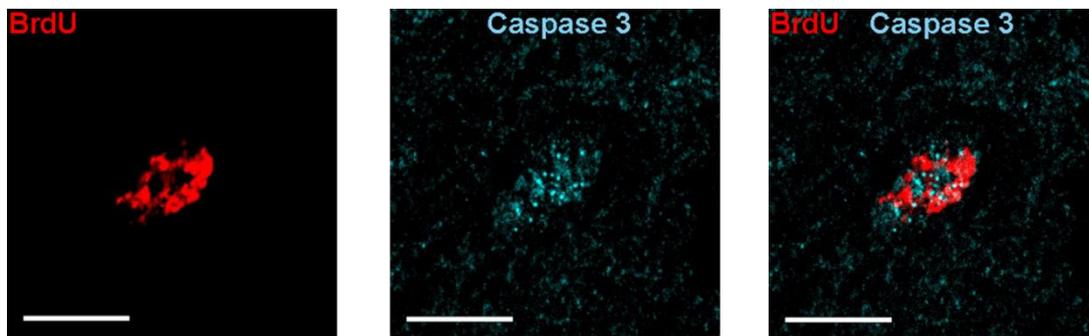


Abb. 4.18 zeigt exemplarisch konfokalmikroskopische Aufnahmen einer Zelle in der SN. Links der BrdU- markierte Zellkern (rot), in der Mitte die Caspase3- positive Zelle (blau) und rechts die Bilder übereinandergelegt. Skala jeweils 10µm.

4.3.7.1 Physiologische Stimuli- Laufradaktivität

Die Messung wurde orientierend an einigen Tieren akut nach MPTP- Läsion durchgeführt. Die Daten der Stichproben (n= 2 Käfige, bzw. 4 Tiere), zeigten zwischen Kontrolltieren und MPTP- Tieren keine Unterschiede in der zurückgelegten Laufstrecke in den ersten drei Versuchstagen. Die täglich zurückgelegte Laufstrecke pro Laufrad in den ersten drei Tagen betrug in der Kontrollgruppe 19720m +/- 1331m, in der MPTP- Gruppe 17680m +/- 1245m. Die Laufstrecke wurde pro Käfig á 2 Tiere gemessen.

4.3.7.2 Physiologische Stimuli fördern die nigrale proliferative Plastizität gesunder Mäuse. Bei MPTP- behandelten Mäusen zeigt sich kein Effekt auf die Proliferation

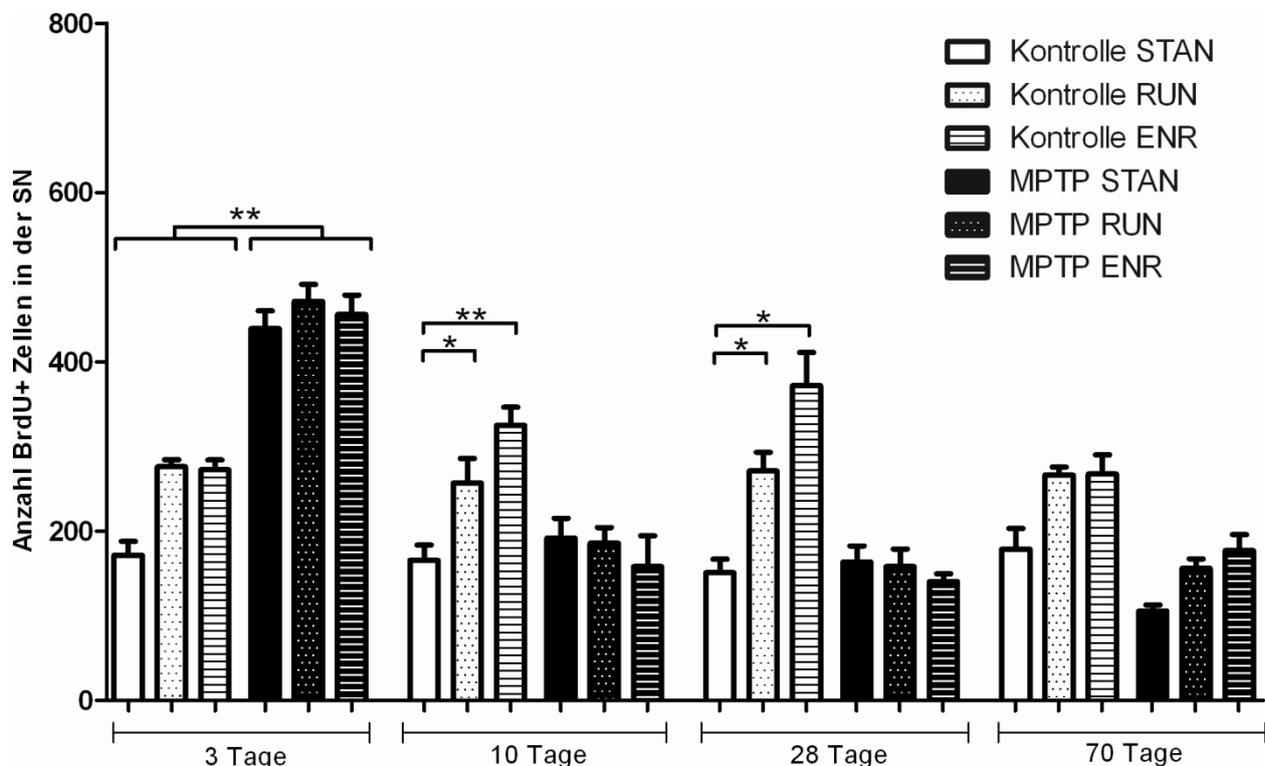


Abb. 4.19 zeigt die absoluten Zahlen BrdU-immunreaktiver (BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen über die vier Untersuchungszeitpunkte, bei unterschiedlichen Haltungsbedingungen (STAN versus RUN versus ENR; n≥ 5). Dreifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen. Zeitangaben beziehen sich auf die Tage nach Versuchsbeginn. STAN= Standardbedingungen, RUN= Laufrad, ENR= Enriched Environment. *(p< 0,05), **(p<0,001).

Analysiert wurden Veränderungen der Zahl nigraler BrdU markierter Zellen von Mäusen durch physiologische Stimuli (Zwischensubjektfaktor, STAN versus. RUN versus ENR) und das Parkinsonmodell (Zwischensubjektfaktor, Kontrolle versus MPTP) über die Zeit (Innersubjektfaktor). Es zeigte sich, dass die nigralen BrdU- Zellzahlen von Mäusen, die freiwilligen Zugang zu einem Laufrad hatten (RUN), oder in reizreicher Umgebung lebten (ENR), verglichen mit den Zellzahlen von Mäusen in Standardkäfigen (STAN), in gesunden- und MPTP- Tieren unterschiedlich waren (dreifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen, Interaktionseffekt zwischen physiologischen Stimuli und Parkinsonmodell, $F_{(2;24)}: 22,0 p < 0,001$). Es zeigte sich, dass physiologische Stimuli nur bei gesunden Tieren zu einer erhöhten Proliferation führten. In MPTP- behandelten Tieren kam es hingegen zu keinem Effekt von RUN oder ENR.

In den *post hoc* Tests zeigte sich, dass die Unterschiede zwischen STAN und physiologischen Stimuli in gesunden Tieren insbesondere nach 10 und 28 Tagen

apparent waren (gesunde Tiere nach 3 Tagen: STAN 171,6 +/- 16,6, RUN 276 +/- 8,4 Bonferroni *post hoc* $p= 0,177$, ENR 272,4 +/- 11,8, Bonferroni *post hoc* $p= 0,265$, nach 10 Tagen: STAN 165,6 +/- 18,3, RUN 286,8 +/-29,1, Bonferroni *post hoc* $p= 0,047$, ENR 325,2 +/- 21,3, Bonferroni *post hoc* $p< 0,001$, nach 28 Tagen: STAN 151,2 +/- 15,8, RUN 271,2 +/-21,9, Bonferroni *post hoc* $p= 0,028$, ENR 372 +/- 39,1 Bonferroni *post hoc* $p< 0,001$ nach 70 Tagen: STAN 178,8 +/- 24,5, RUN 266,4 +/-9,4, Bonferroni *post hoc* $p= 1$, ENR 267,6 +/- 22,6, Bonferroni *post hoc* $p= 0,94$).

In MPTP- Tieren war dies hingegen nie der Fall (nach 3 Tagen: MPTP STAN 439,2 +/- 21,3, MPTP RUN 471,6 +/-20, MPTP ENR 456 +/- 22,9, nach 10 Tagen: MPTP STAN 192 +/- 23,3, MPTP RUN 186 +/-18,5, MPTP ENR 158,4 +/- 36, nach 28 Tagen: MPTP STAN 163,5 +/- 19,2, MPTP RUN 158,4 +/-20,5, MPTP ENR 140,4 +/- 9, nach 70 Tagen: MPTP STAN 105,6 +/- 7,3, MPTP RUN 156 +/-11,2, MPTP ENR 177,2 +/- 18,8)(**Abb. 4.19**).

Der signifikante Interaktionseffekt des Innersubjektfaktors „Zeitpunkte“ und des Zwischensubjektfaktors Parkinsonmodell war bei gegebener Sphärizität ($p= 0,83$) signifikant ($F_{(3;24)}: 81,48, p< 0,001$). Dies entspricht der bereits unter 3.2.) beobachteten Abnahme der BrdU- Zellzahlen über die Zeit, die bei MPTP- behandelten Tieren besonders ausgeprägt war. Am ersten Tötungszeitpunkt nach MPTP- Gabe war unabhängig von den physiologischen Stimuli eine erhöhte Zahl BrdU- positiver Zellen detektierbar, wie dies ebenfalls schon unter 4.2.) der Fall war (nach 3 Tagen: Kontrolle 240 +/- 10,2, MPTP 455,6 +/- 10,2; Innersubjektcontrast Zeitpunkte x Parkinsonmodell, quadratisch: $F_{(1;24)}: 107,5 p< 0,001$).

Zwischen Zeitpunkten und physiologischen Stimuli bestand keine signifikante Interaktion ($F_{(3;24)}: 0,71, p= 0,64$).

4.3.7.3

L-Dopa re-induziert die nigrale zelluläre Proliferation von MPTP-Mäusen

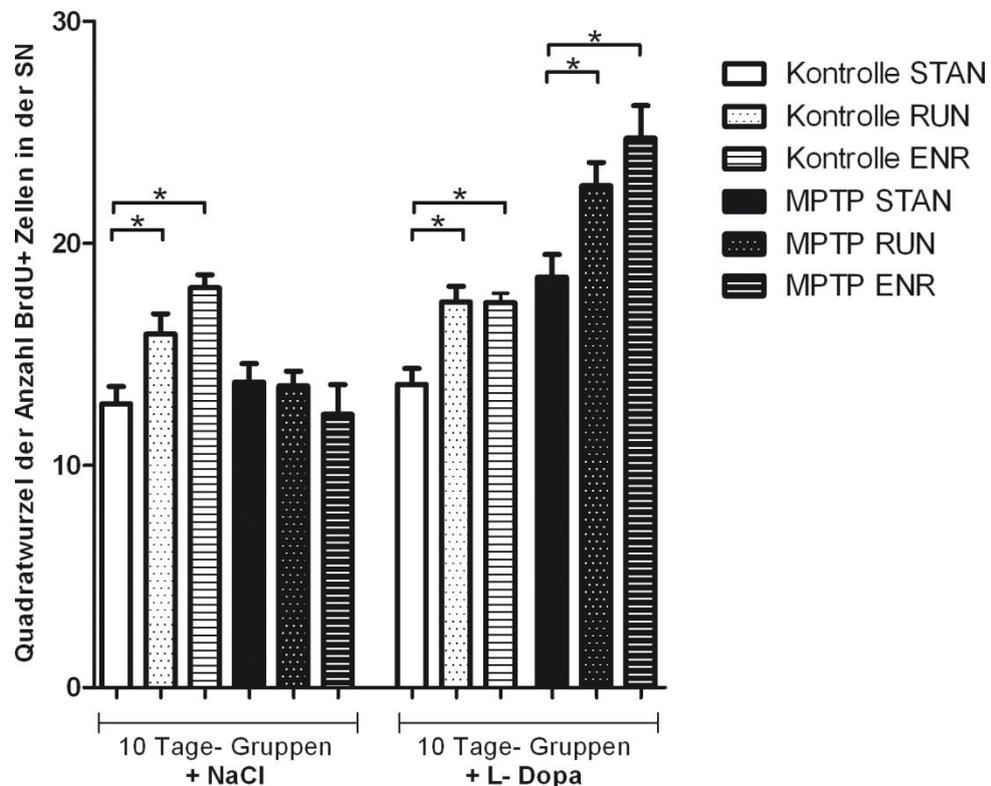


Abb. 4.20 zeigt die absoluten Zahlen BrdU-immunreaktiver (BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen, nach 10 Tagen L-Dopa- oder NaCl- Therapie (0,9% NaCl-Lsg.), bei unterschiedlichen Haltungsbedingungen (STAN versus RUN versus ENR) ($n \geq 5$). Dreifaktorielle ANOVA. STAN= Standardbedingungen, RUN= Laufrad, ENR= Enriched Environment. Daten mittels Ziehen der Quadratwurzel transformiert. $*(p < 0,05)$.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Unterdrückung des proliferationsfördernden Effekts der physiologischen Stimuli durch MPTP nach Dopaminsubstitution reversibel ist. Gesunde und dopamindepletierte Versuchstiergruppen erhielten hierzu über 10 Tage täglich eine Injektion L-Dopa (s. Methoden). Da die Gleichheit der Fehlervarianzen nicht gegeben war (Levene- Test $< 0,05$), wurden die Daten mittels Ziehen der Quadratwurzel transformiert.

Wie bereits bei den Versuchsgruppen in Standardkäfigen gezeigt (s. 4.2.2), ergab sich auch hier signifikante Haupteffekte des Parkinsonmodells (3way ANOVA $F_{(1;48)}: 11,9 p = 0,001$), der Behandlung mit L- Dopa (3way ANOVA $F_{(1;48)}: 74,9 p < 0,001$) und für die Interaktion dieser beiden Effekte (3way ANOVA $F_{(1;48)}: 62,7 p < 0,001$). Das heißt, Tiere,

die MPTP erhalten hatten, reagierten anders auf L-Dopa, als gesunde Kontrollen, nämlich mit erhöhter Zahl BrdU- positiver Zellen (**Abb. 4.20**).

Zusätzlich ergab sich ein signifikanter Haupteffekt (3way ANOVA $F_{(2;48)}: 15,3 p < 0,001$) für die physiologischen Stimuli (RUN und ENR) gegenüber der Haltung ohne Stimulation (STAN) und ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen physiologischen Stimuli, L-Dopa und MPTP-Modell (3way ANOVA $F_{(2;48)}: 6,5 p = 0,003$). Es zeigte sich, dass bei MPTP-, plus L-Dopa behandelten Versuchstiergruppen physiologische Stimuli zu einer erhöhten Zellproliferation führten (MPTP L-Dopa STAN 345,6 +/- 86,4 (transformiert 18,5 +/- 2,3) versus MPTP L-Dopa ENR 620,4 +/- 159,5 (transformiert 24,7 +/- 3,2) Bonferroni *post hoc test*: $p = 0,001$). Die Substitution des durch MPTP induzierten Dopaminmangels ermöglichte es, den proliferationsfördernden Effekt der physiologische Stimuli wiederherzustellen und somit einen ähnlichen Effekt auf die nigrale Zellproliferation zu erzielen wie bei gesunden Tieren.

Wenn die Versuchstiere hingegen gesund waren, hatte L-Dopa keinen Effekt und die physiologischen Stimuli wirkten nicht stärker als bei NaCl- behandelten Tieren (Kontrolle L-Dopa RUN 285,6 +/- 39,7 (transformiert 16,9 +/- 1,2) versus Kontrolle RUN 256,8 +/- 65 (transformiert 15,9 +/- 2) Bonferroni *post hoc test* : $p = 1$, Kontrolle L-Dopa ENR 301,2 +/- 32,1 (transformiert 17,3 +/- 0,9) versus Kontrolle ENR 325,2 +/- 47,5 (transformiert 18 +/- 1,3) Bonferroni *post hoc test* : $p = 1$).

4.3.8.1

Physiologische Stimuli beeinflussen spezifisch die Proliferation NG2-positiver Zellen in gesunder SN

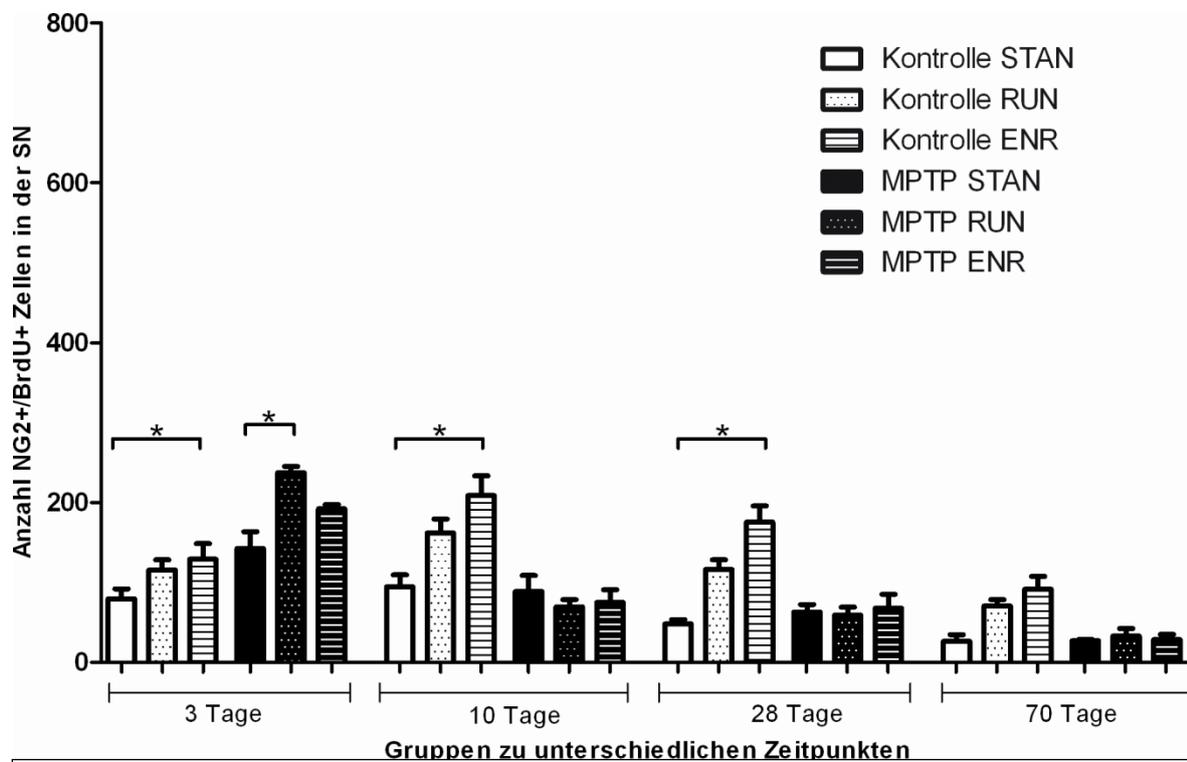


Abb. 4.21 zeigt die absoluten Zahlen NG2- und BrdU- immunreaktiver (NG2+/BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen über die vier Untersuchungszeitpunkte, bei unterschiedlichen Haltungsbedingungen (STAN versus RUN versus ENR; $n \geq 5$). Dreifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen. Zeitangaben beziehen sich auf die Tage nach Versuchsbeginn. STAN= Standardbedingungen, RUN= Laufrad, ENR= Enriched Environment. $*(p < 0,05)$.

Zur Klärung der Frage, welche mitotisch aktive Zellpopulationen für die erhöhten Zahlen proliferierter Zellen durch physiologische Stimulation verantwortlich sind, wurden alle nigralen BrdU- markierten Zellen immunotypisiert und quantifiziert. Hierfür kamen die bereits erwähnten Marker zum Einsatz (s.o.). Der Großteil der Zellen, die von RUN und ENR beeinflusst wurden, war dabei immunopositiv für den Marker NG2.

Physiologische Stimuli zeigten signifikante Effekte auf die Zahl NG2- positiver und gleichzeitig BrdU- positiver Zellen (3way ANOVA mit Messwiederholungen, Zwischensubjekteffekt physiologische Stimuli $F_{(2;19)}: 38,6 p < 0,001$). Der signifikante Interaktionseffekt zwischen Parkinsonmodell und physiologischen Stimuli ($F_{(2;19)}: 17,8 p < 0,001$) zeigt, dass die physiologischen Stimuli nur bei gesunden Tieren wirkten, wie auch einige Bonferroni *post hoc* Tests für die reizreiche Umgebung (ENR) bestätigen: Signifikante Erhöhungen der Zahlen BrdU-positiver, plus NG2- positiver Zellen bei ENR gegenüber STAN zeigten sich dabei nach 10 und 28 Tagen in gesunden Kontrolltieren (nach 3 Tagen: STAN $79,5 \pm 12,6$, ENR $129 \pm 19,7$ Bonferroni *post*

hoc $p=1$, nach 10 Tagen: STAN 94,5 +/- 15, ENR 208,8 +/- 24,6 Bonferroni *post hoc* $p < 0,001$, nach 28 Tagen: STAN 48 +/- 5,5, ENR 175,5 +/- 20,1 Bonferroni *post hoc* $p < 0,001$; nach 70 Tagen: STAN 26,4 +/- 8,2, ENR 91,5 +/- 16 Bonferroni *post hoc* $p=0,66$). Beim Vergleich von RUN- mit STAN- Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei *post hoc* Tests (nach 3 Tagen: STAN 79,5 +/- 12,6, RUN 115,5 +/- 12,6 Bonferroni *post hoc* $p=1$; nach 10 Tagen: STAN 94,5 +/- 15, RUN 162 +/- 17,3 Bonferroni *post hoc* $p=0,463$; nach 28 Tagen: STAN 48 +/- 5,5, RUN 116,4 +/- 11,6 Bonferroni *post hoc*: $p=0,404$; nach 70 Tagen: Kontrolle: STAN 26,4 +/- 8,2, RUN 70,5 +/- 7,9, Bonferroni *post hoc* $p=1$) (**Abb. 4.21**).

In der SN MPTP behandelten Mäuse war eine Erhöhung der Zahl BrdU- plus NG2- markierter Zellen durch Laufradaktivität nur temporär in den 3 Tage- Gruppen zu verzeichnen (Nach 3 Tagen: MPTP STAN 142,5 +/- 20,8, MPTP RUN 237,5 +/- 7,5 Bonferroni *post hoc* $p < 0,001$, MPTP ENR 190,5 +/- 6,2 Bonferroni *post hoc* $p=1$). Zu späteren Zeitpunkten war kein Effekt durch RUN und ENR auf MPTP- Tiere detektierbar (Nach 10 Tagen: MPTP STAN 88,8 +/- 19,9, MPTP RUN 69,6 +/- 9, Bonferroni *post hoc* $p=1$, MPTP ENR 75 +/- 15,8, Bonferroni *post hoc* $p=1$; Nach 28 Tagen: MPTP STAN 63 +/- 9,3, MPTP RUN 58,8 +/- 10,1 Bonferroni *post hoc* $p=1$, MPTP ENR 73,5 +/- 16,3 Bonferroni *post hoc* $p=1$; Nach 70 Tagen: MPTP STAN 27 +/- 1,7, MPTP RUN 33 +/- 9,3 Bonferroni *post hoc* $p=1$; MPTP ENR 28,5 +/- 6,7 Bonferroni *post hoc* $p=1$).

Der signifikante Interaktionseffekt des Innersubjektfaktors „Zeitpunkte“ und des Zwischensubjektfaktors Parkinsonmodell war bei gegebener Sphärizität ($p=0,237$) signifikant ($F_{(3;24)}: 28,9, p < 0,001$). Dies entspricht der bereits unter 3.3.3) beobachteten Abnahme der NG2- Zellzahlen über die Zeit. Hier ist die Abnahme bei MPTP- behandelten Tieren besonders ausgeprägt. Zwischen Zeitpunkten und physiologischen Stimuli bestand keine signifikante Interaktion ($F_{(3;24)}: 1,44, p=0,22$).

4.3.8.2

Physiologische Stimuli wirken in MPTP- Mäusen proliferativ auf NG2-positive Zellen, in Abhängigkeit von L-Dopa

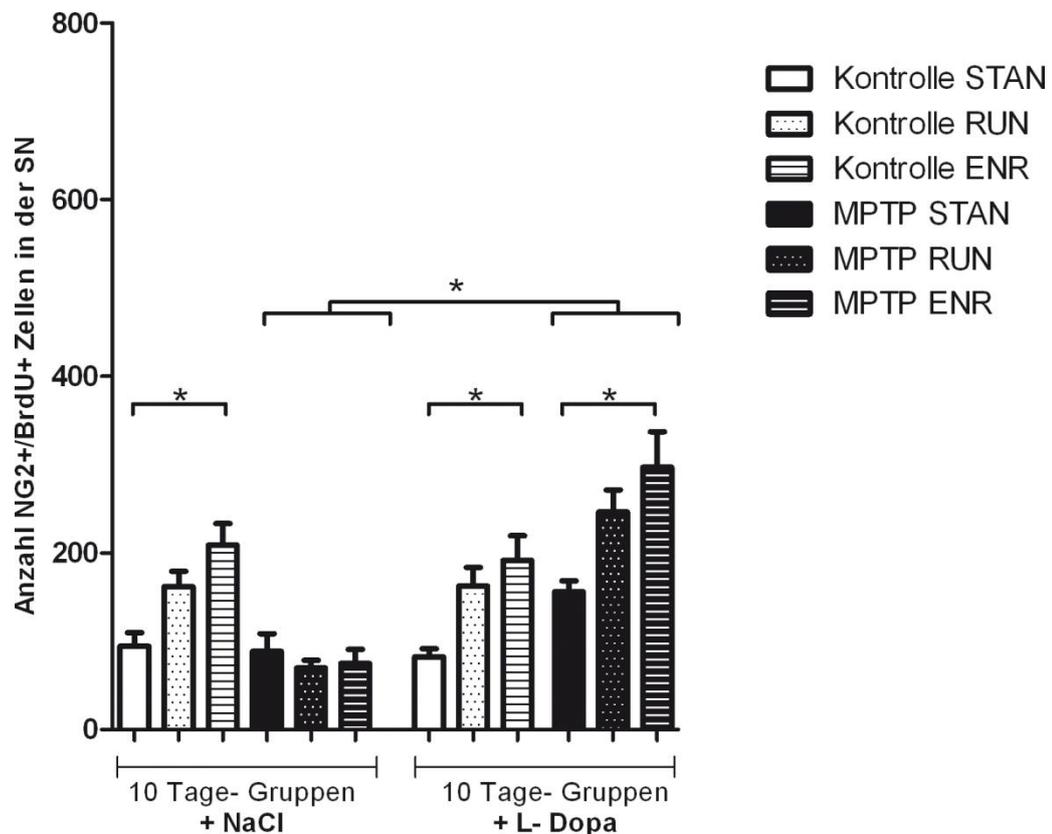


Abb. 4.22 zeigt die absoluten NG2- und BrdU- immunreaktiver (NG2+/BrdU+) Zellen in der SN von MPTP- und Kontrollgruppen, nach 10 Tagen L-Dopa- oder NaCl- Therapie (0,9% NaCl-Lsg.), bei unterschiedlichen Haltungsbedingungen (STAN versus RUN versus ENR; $n \geq 5$). Dreifaktorielle ANOVA. STAN= Standardbedingungen, RUN= Lauftrad, ENR= enriched Environment. *($p < 0,05$).

Des Weiteren galt es zu untersuchen, wie NG2- positive Zellen von physiologischen Stimuli im Zusammenspiel mit Dopamindepletion und- substitution beeinflusst werden. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob nigrale, NG2- positive- plus BrdU-positive Zellen in MPTP- behandelten Mäusen nach Dopaminsubstitution auf physiologische Stimuli ansprechen. Die Annahme der Gleichheit der Fehlervarianzen (Levene- Test = 0,253) war gegeben. Wie bereits unter Bedingungen ohne physiologische Stimuli ersichtlich (s. 4.3.3.2) zeigten sich auch hier signifikante Interaktionen der Faktoren „Parkinsonmodell“ und „L- Dopa- Behandlung“ (3way ANOVA $F_{(1;41)}: 55,5 p < 0,001$). Bei Tieren, die mit MPTP- behandelt wurden, führte L-Dopa zu einer Erhöhung der Zahl NG2- positiver-/ BrdU- positiver Zellen. Bei gesunden Tieren hatte L- Dopa keinen Effekt (**Abb. 4.22**).

Des Weiteren ergab sich ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen physiologischen Stimuli, L-Dopa- Behandlung und Parkinsonmodell (3way ANOVA $F_{(2;41)}: 6,2 p = 0,005$).

Die *post hoc* Analyse zeigte, dass der physiologische Stimulus ENR die Zellproliferation in MPTP- plus L-Dopa- behandelten Tieren erhöhte. Die Veränderungen durch RUN waren nicht signifikant (MPTP L-Dopa STAN 156 +/- 12,3 versus MPTP L-Dopa RUN 261,6 +/- 25,7, Bonferroni *post hoc test*: $p= 0,302$; versus MPTP L-Dopa ENR 297 +/- 40,4, Bonferroni *post hoc test*: $p= 0,002$).

Wenn die Versuchstiere gesund waren, hatte L-Dopa keinen zusätzlichen Effekt und die physiologischen Stimuli wirkten nicht stärker als bei NaCl- behandelten Tieren (Kontrolle STAN 94,5 +/- 15, Kontrolle L-Dopa STAN 86,5 +/-10,7 Bonferroni *post hoc test* : $p= 1$, Kontrolle RUN 162 +/- 38,7, Kontrolle L-Dopa RUN 162,5 +/- 21,1 Bonferroni *post hoc test* : $p= 1$, Kontrolle ENR 208,8 +/- 24,6, Kontrolle L-Dopa ENR 148 +/- 11,4 Bonferroni *post hoc test* : $p= 1$, **Abb. 4.22**).

Es reagierten also 1.) Tiere, die MPTP erhalten hatten, anders auf L-Dopa, als gesunde Kontrollen, nämlich mit erhöhter Zahl BrdU-positiver plus NG2- positiver Zellen (**Abb. 4.11** und **Abb. 4.22**). Und 2.), die Zahl NG2-positiver-, plus BrdU- positiver Zellen wurde durch den physiologischen Stimulus ENR nur erhöht, wenn die MPTP-Tiere L-Dopa bekamen. Die Substitution des durch MPTP induzierten Dopaminmangels ermöglichte es, den proliferationsfördernden Effekt der physiologische Stimuli wiederherzustellen, somit einen vergleichbaren Effekt auf die nigrale Proliferation von OPCs zu erzielen, wie bei gesunden Tieren.

4.3.9 Physiologische Stimuli haben keinen Einfluss auf die Bildung reifer Oligodendrozyten

Die Zahl BrdU- positiver plus CNPase- positiver Zellen, also im Untersuchungszeitraum gebildeter reifer Oligodendrozyten, wurde von den physiologischen Stimuli nicht beeinflusst (3way ANOVA mit Messwiederholungen, Zwischensubjekteffekt physiologische Stimuli $F_{(2;18)}$: 1,3 $p= 0,307$). Es bestand auch kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen Parkinsonmodell und physiologischen Stimuli (3way ANOVA $F_{(2;18)}$: 0,4 $p= 0,665$) oder sonstigen Faktoren. Auch die Behandlung mit L-Dopa konnte keinen Effekt der physiologischen Stimuli auf die Zahl BrdU- markierter, reifer Oligodendrozyten herbeiführen (3way ANOVA $F_{(1;36)}$: 1,6 $p= 0,227$), sonstige signifikante Interaktionen bestanden ebenfalls nicht.

4.3.10 Physiologische Stimuli haben keinen Einfluss auf Proliferation und Überleben Nestin- und Iba1- positiver Zellen

Die Anzahl Iba1-positiver/BrdU- positiver Zellen, oder NestinGFP-positiver/BrdU-positiver Zellen wurde stichprobenartig (n= 2-5) überprüft. Dabei zeigte sich nie ein Einfluss physiologischer Stimuli auf diese Zelltypen (deskriptive Statistik der Kontrollen für NestinGFP-positive/BrdU-positive Zellen: nach 3 Tagen STAN 14,4 +/- 4,5, RUN 21,6 +/- 9,1, ENR 18 +/- 6,9, nach 10 Tagen: STAN 8,4 +/- 3,1, RUN 8,4 +/- 3,7 ENR 13,2 +/- 7,8, nach 28 Tagen: STAN 9 +/- 4,5, RUN 12,2 +/- 6,4, ENR 10,5 +/- 7,5; nach 70 Tagen: STAN 3,6 +/- 2,4, RUN 1,5 +/- 1,5 ENR 3 +/- 1,7; deskriptive Statistik der Kontrollen für Iba1-positive/BrdU-positive Zellen nach 3 Tagen STAN 25,5 +/- 10,2, RUN 30 +/- 11,7, ENR 25 +/- 13,9, nach 10 Tagen: STAN 27 +/- 11,1, RUN 22,5 +/- 11,3 ENR 21 +/- 11, nach 28 Tagen: STAN 15 +/- 7,3, RUN 12,2 +/- 6,1, ENR 13,3 +/- 6,2; nach 70 Tagen keine Daten erhoben)..

4.4 In Zellkultur lässt sich kein neurogenes Potential Nestin- positiver Zellen in der SN nachweisen

Da initial durch MPTP eine Erhöhung der nigralen NestinGFP- positiven/ BrdU- positiven Zellen, beobachtet wurde, sollte mittels Sphärenkultur das neurogene Differenzierungspotential dieser Zellen *in vitro* beurteilt werden. Als Positivvergleich wurde aus denselben Tieren Material aus der bekanntermaßen neurogenen subventrikulären Zone (SVZ) und der periventrikulären Zone gewonnen und kultiviert.

Nach 7-10 Tagen *in vitro* konnten in den Zellansätzen Nestin- positive Neurosphären gleicher Morphologie gefunden werden, unabhängig davon, aus welcher Hirnregion das Gewebe ursprünglich entnommen worden war.

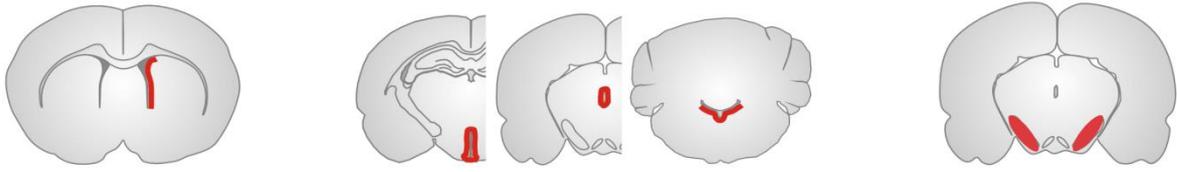
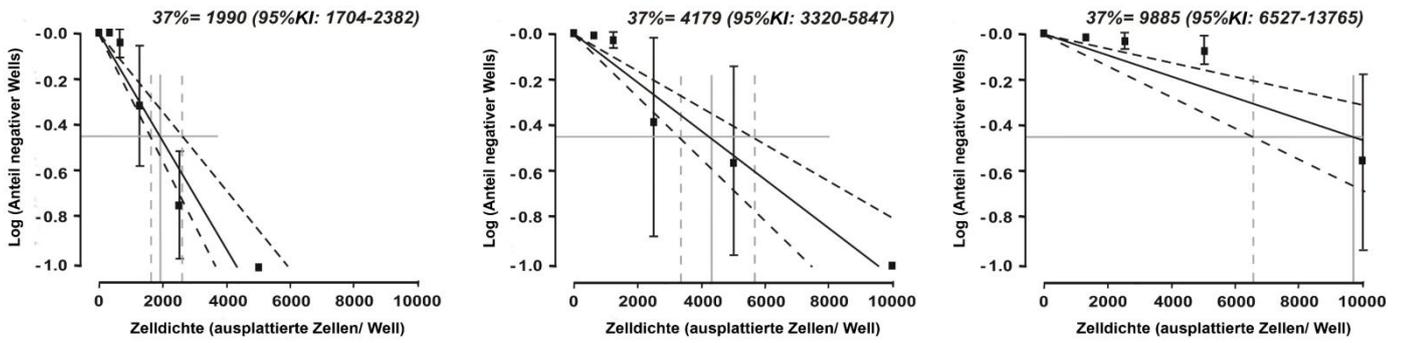
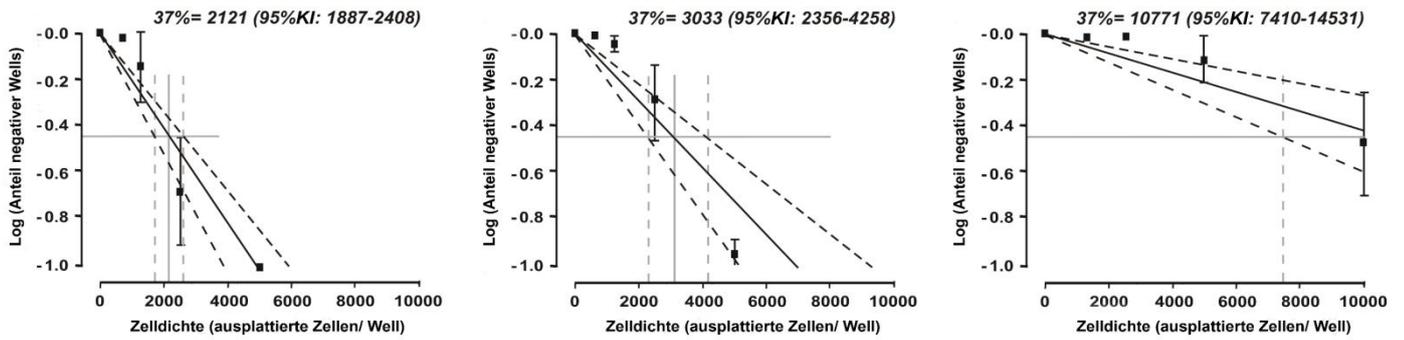
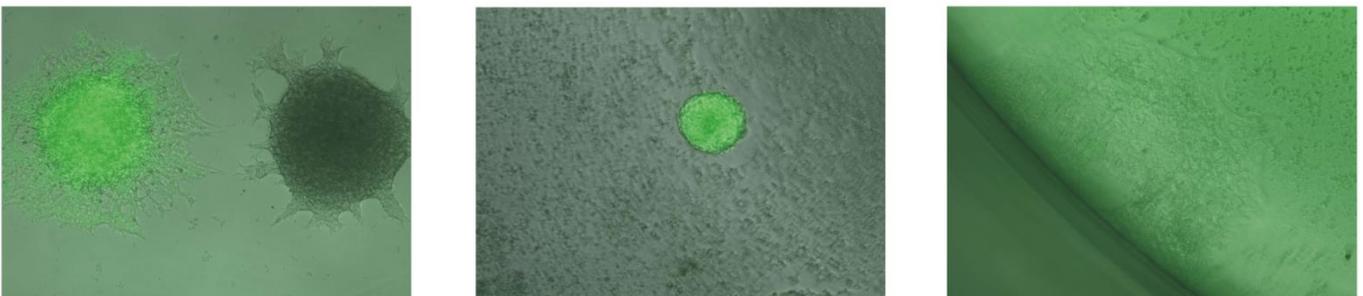
In den zellkulturellen Ansätzen aus der SN konnten jedoch nur sehr wenige Neurosphären detektiert werden. Nach der Methode von Lefkovits und Waldmann (1984), konnte aus dem nigralen Gewebe der Kontrolltiere eine Kolonie- bildende, Nestin- positive Zelle pro 9885 (95%KI 6527-13765) isolierter Zellen detektiert werden (s. Abb). Im Vergleich war aus der subventrikulären Zone eine Kolonie- bildende, Nestin- positive Zelle pro 1990 (95%KI 1704-2382) isolierter Zellen detektierbar.

Eine weitere Typisierung der Zellen mittels immunologischer Marker gegen andere charakteristische neurale Zellproteine (NG2, Sox2, Olig2) gelang nicht.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Zahl der Neurosphären gesunder Kontrollen und MPTP- behandelte Tiere (SN: MPTP 10771, 95%KI 7410-14531). Auch Morphologie und Nestin-GFP-Expression waren unverändert.

Aufgrund der sehr geringen Anzahl Nestin- positiver, nigraler Neurosphären war eine Langzeitkultur mit weiterer Charakterisierung der Zellen nicht möglich.

Auf der folgenden Seite zeigt **Abbildung 4.23** die Ergebnisse der Sphärenkultur aus drei mikrodissezierten Hirnregionen. Linke Spalte: SVZ der lateralen Seitenventrikel, mittlere Spalte: Periventrikuläre Region um dritten-, vierten Ventrikel und Aquädukt, rechte Spalte: Substantia nigra **A**) schematische Darstellung der Hirnregionen aus denen das Gewebe für die Zellkultur mikrodisseziert wurde. **B**) Grenzverdünnungsanalyse für Neurosphären aus den drei unterschiedlichen Hirnregionen bei Kontrolltieren (n=3). Der Wert nach 37% (Anteil negativer Wells) gibt die ausplattierte Zelldichte (mit 95%- Konfidenzintervall) an, bei der sich pro Well eine Vorläuferzelle befand aus der sich eine Neurosphäre gebildet hatte. Je niedriger dieser Wert, desto höher die potentielle Neurogenität des isolierten Gewebes. Zum Beispiel bildete sich pro 1990 isolierter Zellen der PVR (linke Spalte) eine Neurosphäre. Aus der Graphik lässt sich am Schnittpunkt des Logarithmus (37% negative Wells) mit der linearen Regressionsgeraden auf der Abszisse die Frequenz Neurosphären bildender Zellen ablesen. **C**) Grenzverdünnungsanalyse für Neurosphären aus den drei unterschiedlichen Hirnregionen bei MPTP- behandelten Tieren (n=6). **D** und **E**) Fotos repräsentativer Nestin-GFP- positiver Neurosphären nach einer Woche Expansion *in vitro* in Kontrolltieren (**D**) und MPTP- Tieren (**E**).

A**B****C****D****E**

Modifiziert nach Klaisle et al. 2012

5. Diskussion

Nach der Darstellung der Untersuchungsergebnisse im vorherigen Abschnitt, soll in der folgenden Diskussion deren Bedeutung vor dem Hintergrund des aktuellen Forschungsstandes beurteilt werden.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Tierhaltung und physiologische Stimuli

Zum Vergleich des Einflusses physiologischer Reize auf die nigrale zelluläre Plastizität, wurden die Tiere in Standardkäfigen (STAN), Käfigen mit Laufrad (RUN) oder Käfigen, die eine reizreiche Umgebung boten (ENR) gehalten. Am etablierten Versuchsmodell zu ENR wird kritisiert, dass die gebotene Situation und Reizstimulation im Labor, verglichen mit den Bedingungen und Reizen in freier Wildbahn, eher als „reizdeprivierte Umgebung“ aufzufassen ist (Cummings et al., 1977). Reizreich ist sie nur im Vergleich zur noch stärker reizdeprivierten Umgebung in Standardkäfigen. Auch das freiwillige Laufen im Laufrad bietet die Möglichkeit zu erhöhter physischer Aktivität nur im Vergleich zu Standardkäfigen. Zudem ist der Antrieb für die Bewegung im Labor ein anderer als in freier Wildbahn. Während die Aktivität dort oft durch Zwänge, wie Nahrungssuche oder Flucht vor Gefahren bedingt ist, überwiegen im Labor Neugier und Spieltrieb als Bewegungsantrieb (Sale et al., 2009). Der Vergleich mit den Lebensbedingungen in natürlichem Umfeld ist daher schwer möglich. Der Stimulus und seine Wirkung kann nur im Verhältnis zur Vergleichsbedingung im Labor gesehen werden. Aber erst die standardisierten Laborbedingungen, unter Ausschaltung vieler Störfaktoren, wie zusätzlicher Reize durch variable Umgebung, Nahrung, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Lichtrhythmus, ermöglichen überhaupt die weitgehend isolierte Betrachtung eines Stimulus (hier z.B. RUN und ENR) auf eine abhängige Variable (hier proliferierte Zellen).

Unter diesen Bedingungen liefern die methodischen Möglichkeiten des Labors wertvolle Informationen zum Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge und Regulationsmechanismen. Dies kann als Grundlage für weitere, verifizierende Studien in natürlicherem Umfeld dienen und zur Erarbeitung und Erprobung therapeutischer Konzepte bei assoziierten Pathomechanismen in realen Lebenssituationen beitragen.

5.1.2 Lauftradaktivität

In bisher nicht publizierten Daten eines zeitgleich ablaufenden Projekts unserer Arbeitsgruppe zum MPTP- Parkinsonmodell an weiblichen C57/BL6 Mäusen in Laufradkäfigen, hatten sich zwischen MPTP- Versuchsgruppen und Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Laufstrecke im Lauftrad gezeigt. Da das experimentelle Design der vorliegenden Arbeit bezüglich des MPTP- Modells, Injektionsschemas und der Haltungsbedingungen im Laufradkäfig methodisch mit dem Design des anderen Projekts übereinstimmt, wurde die Lauftradaktivität hier nur orientierend an einigen, zufällig ausgewählten Mäusen aus Kontrollgruppe und MPTP- Gruppe pro Käfig gemessen. Da sich pro Käfig zwei Mäuse ein Lauftrad teilten, konnte hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass die Lauftradaktivität der jeweiligen Mäuse eines Käfigs unterschiedlich war.

5.1.3 Das MPTP- Parkinsonmodell der Maus

An der adulten C57/BL6 Maus ist das Parkinsonmodell sehr gut untersucht und führt sowohl bei akuten, als auch bei subakuten Injektionsschemata zu einer Reduktion der Anzahl TH- immunreaktiver Zellen in der SNpc um 25- 70%, abhängig von Applikationsdosis, -frequenz, -dauer und dem Alter der Tiere (Sedelis et al., 2001, Jackson- Lewis und Przedborski, 2007). Die gebräuchlichsten Injektionsschemata (akut: 4x 20mg/kg alle 2h, subakut: 5x 20-30mg/kg über 5 Tage) wurden an über 22g schweren Männchen etabliert und führen bei Weibchen, die oft unter 22g wiegen, zu erhöhten Todesraten (Jackson- Lewis und Przedborski, 2007). Dies zeigte sich auch in dieser Studie bei Vorversuchen, mit Mortalitäten bis zu 25%. Um die Todesraten bei konstanter Läsion unter 10% zu halten, passten wir das subakute Injektionsschema an, auf 3x 20 mg/kg über 3 Tage. Beim Vergleich der Daten mit Ergebnissen anderen Studien, muss daher das Geschlecht der Versuchstiere und das veränderte Injektionsschema beachtet werden.

Unabhängig von Injektionsschema und Geschlecht ist zu betonen, dass das MPTP- Mausmodell zwar einige Aspekte des idiopathischen Parkinsonsyndroms beim Menschen imitiert, aber nicht als dessen Homologie gelten darf. Bei Nagern existiert in der Natur kein IPS und dieses Toxin-basierte Parkinsonmodell der Maus ist zwar das am weitesten verbreitete und am besten validierte, das insbesondere die Schädigung des dopaminergen Systems gut imitiert, aber eine unkritische Übertragung der

Ergebnisse auf das IPS beim Menschen ist nicht möglich (für Übersicht s. Jackson-Lewis und Przedborski, 2007). Da bei dieser Arbeit jedoch das dopaminerge System und dessen Einfluss auf die zelluläre Proliferation im Vordergrund standen, sich beispielsweise bei genetischen Tiermodellen aber kein nigraler Dopaminmangel entwickelt, eignete sich das verwendete MPTP- Mausmodell für die durchgeführten Versuche am besten.

5.1.4 BrdU und die Detektion proliferierender Zellen

Beim hier verwendeten BrdU- Applikationsschema mit einer einmaligen Injektion von 50mg/kg KG, nehmen Zellen BrdU auf, die sich in der S- Phase der Mitose befinden (Cameron und McKay, 2001). Zu bedenken ist dabei, dass BrdU eine Bioverfügbarkeit von weniger als einer Stunde hat (Wright und Alison, 1984). In diesem kleinen Zeitfenster kann daher nur ein Bruchteil der mitotisch aktiven, proliferierenden Zellen markiert werden (Gould und Gross, 2002) und Zellen, die sich danach teilen, sind nur markiert, wenn sie aus dann bereits BrdU- markierter Zellen hervorgehen.

Bei den genannten Zahlen BrdU- markierter, also proliferierter Zellen in vorliegender Arbeit handelt es sich daher nicht um die Gesamtzahl aller nigral proliferierter Zellen. Der Einfluss später applizierter Faktoren kann nur auf die dann bereits BrdU- markierte Zellpopulation detektiert werden. Der Vorteil des verwendeten Schemas ist jedoch, dass das Alter der markierten Zellen klarer bestimmbar ist, und deren Differenzierung und Überleben im Verlauf zeitlich eingeordnet werden kann.

Bei mehrfachen Injektionen und höherer Dosis würden mehr mitotische Zellen markiert, aber der zeitliche Verlauf der Zellentwicklung könnte bei längerem Applikationszeitraum weniger scharf beurteilt werden und eine höhere Dosis ginge mit erhöhter Toxizität und Mutagenität von BrdU einher (Cameron und McKay, 2001). Zudem wird bei höherer Dosis auch verstärkt BrdU in Zellen integriert, die nicht proliferieren, z.B. bei DNA-Reparatur und Apoptose (Rakic, 2002). Bei der hier verwendeten Dosis ist dieses Risiko nicht gegeben (Cooper Kuhn und Kuhn, 2002). Da alle Tiere die gleiche Dosis BrdU erhielten, blieb, trotz gruppenübergreifend geringer markierter Zellzahl im Vergleich zur Gesamtproliferation, die Vergleichbarkeit der Zellzahlen verschiedener Versuchstiergruppen untereinander erhalten. Zudem ist das hier verwendete BrdU- Applikationsschema bei Studien zu zerebralen Proliferationsvorgängen weit verbreitet (Kronenberg et al., 2003, Shan et al., 2006, Steiner et al., 2004, 2006, 2008 u.A.), so

dass die Vergleichbarkeit mit anderen Studienergebnissen zum selben Themenkomplex in dieser Hinsicht gegeben ist.

5.1.5 Phänotypische Klassifikation der proliferierten Zellen

Die Zuordnung der markierten Zellen erfolgte am konfokalen Mikroskop. Die Möglichkeit der Identifizierung proliferierter Zellen über die Kolokalisation Antikörper- gekoppelter Chromogene, setzt ein spezifische Färbung der Zellen und gleichbleibend hohe Qualität der Immunfluoreszenz voraus.

Mittels standardisierter Protokolle, gleichbleibender Umgebungsbedingungen, gleicher technischer Geräte und denselben Untersuchern, wurde das Risiko unterschiedlicher Färbeergebnisse minimiert.

Dennoch waren leichte Unterschiede in der Intensität und Spezifität der Fluoreszenz zwischen einzelnen Färbungen, bei gleichem Antikörper und Chromogen nicht zu vermeiden, wodurch die Bewertung, ob eine die Kolokalisation in einer Zelle vorlag erschwert wurde. Diese Unterschiede könnten an leichten Raumtemperaturschwankungen, minimalen Schwankungen von Inkubationszeiten, oder unterschiedlicher Lagerungsdauer der Präparate liegen.

Durch Vergleiche mit anderen Immunfluoreszenzfärbungen derselben Antikörper und Negativproben ohne Primärantikörper, sowie mit Hilfe von Serienaufnahmen in Z-Ebene (Z- axis stacks), die die räumliche Zuordnung der Chromogene erlaubten, wurde die Aussagekraft über mögliche Kolokalisationen erhöht (Vgl. Singh und Gopinathan, 1998).

Im transgenen pNestin- GFP Modell für C57BL/6 Mäuse wird das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert und dabei vom Nestinpromotor reguliert. Wenn eine Zelle Nestin exprimiert, wird zusätzlich GFP als Marker exprimiert und die Zelle ist aufgrund der grünen Fluoreszenz detektierbar. Da Nestin als Marker für neurale Vorläuferzellen gilt, kann so die Detektion neuraler und früher neuronaler Differenzierungsprozesse *in vivo* erreicht werden (Yamaguchi et al., 2000).

Die GFP- Expression entspricht dabei weitgehend der Nestin- Expression. Im Bulbus olfactorius wurden jedoch GFP- markierte Zellen gefunden, die kein Nestin exprimierten (Yamaguchi et al., 2005). Es wird angenommen, dass der Abbau von GFP länger dauert, als der von Nestin. Das heißt, dass GFP länger mikroskopisch erfasst wird, als Nestin vorhanden ist (García, 2008). Dies vergrößert das Zeitfenster, in dem neurale

Vorläuferzellen detektiert werden können und erhöht dabei die Wahrscheinlichkeit, dass reifere Zellmarker gleichzeitig in noch GFP-positiven Zellen detektiert werden können. So kann die Differenzierung Nestin-GFP- positiver neuraler Vorläuferzellen nachverfolgt werden. Die mikroskopisch detektierbare GFP- Expression gilt als präzise Repräsentation neuraler Vorläuferzellen im transgenen Nestin- GFP- Modell (Mignone et al., 2004). Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass Nestin nach Nervenzellschädigung, im Rahmen von Ischämie, Epilepsie und Entzündung, auch in kapillären Endothelzellen exprimiert wird (Gilyarov, 2008). Durch die Überprüfung der Lokalisation und einer Kolo-kalisation GFP- positiver und vWF- positiver Zellen, sowie weiterer Zellmarkern wurden die Zellen nach Möglichkeit weiter klassifiziert.

5.1.6 Lokalisation der markierten Zellen in der SN Pars compacta und Pars reticulata

Die beiden Kerngebiete der Substantia nigra, die Pars compacta (SNpc) und die Pars reticulata (SNpr) sind beide Teil basalganglionärer Schaltkreise die u.a. bei der Regulation der Motorik, wie Bewegungsinitiation und Timing mitwirken (Fan et al., 2012). Während die dopaminergen Neuronen der SNpc zum Großteil in Striatum und Thalamus projizieren und diejenigen sind, die beim IPS degenerieren (s.o.), sind die Neuronen der SNpr hauptsächlich GABAerg, mit zahlreichen Efferenzen, u.a. in Thalamus, Sehbahn, Hirnstamm und Mittelhirn, die beim IPS nicht untergehen (Zhou und Lee, 2011, Fan et al., 2012). Die beiden Regionen innervieren sich auch gegenseitig (s.o.). In hier nicht dargestellten, publizierten Daten (vgl. Klaissle et al., 2012) aus der Untersuchungen des Materials, fanden sich absolut niedrigere Zahlen BrdU- markierter Zellen in der SNpc als in der SNpr. Im Verhältnis war deren Entwicklung über die Zeit jedoch nahezu gleich. Es zeigte sich nach 3 Tagen ein Anstieg der proliferierten Zellen in MPTP-behandelten Tieren, welcher jedoch bereits ab dem 10 Tag gleichermaßen in SNpc und SNpr nicht mehr nachweisbar war (Klaissle et al., 2012). Daher und aufgrund der insgesamt geringen Zahlen markierter Zellen in dieser Studie, wurde die Lokalisation der detektierten Zellen innerhalb der Substantia nigra nicht weiter differenziert.

5.1.7 Auswirkung von MPTP auf die physische Aktivität

Die orientierende Messung der Laufradaktivität der ersten drei Tagen zeigte keine Unterschiede zwischen MPTP- behandelten- und gesunden Tieren. Mäuse die MPTP

erhalten hatten, liefen in den ersten drei Tagen, in welchen die Applikation erfolgte, die gleichen Strecken wie NaCl- behandelte, gesunde Mäuse. Auch nach Abschluss der MPTP Behandlung war die Laufstrecke gesunder und dopamindepletierter Versuchstiere unverändert.

Die Untersuchungen anderer Forscher zur Laufradaktivität nach MPTP- Gabe ergaben teils andere Ergebnisse (Leng et al., 2004, Liebetanz et al., 2007). Dort zeigte sich, dass die freiwillige Laufradaktivität durch das subakute MPTP- Modell sehr kurzfristig nach Läsion vermindert ist. Bereits innerhalb eines Tages war sie jedoch ebenfalls wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehrt. Die MPTP- Dosen waren in jenen Untersuchungen höher als die hier verwendeten (4x 40mg/kg über 4 Tage bei Leng, 5x 30mg/kg über 5 Tage bei Liebetanz). Dies könnte eine transiente motorische Einschränkung jener Tiere erklären.

Die festgestellte kurzfristig verminderte Laufradaktivität nach MPTP- Läsion in jenen Studien wird jedoch nicht auf die Neurodegeneration zurückgeführt, sondern am ehesten auf die akute zentralnervöse und periphere Wirkung des Opioids MPTP, wie z.B. veränderte Monoaminausschüttung und verminderte Körpertemperatur (Mitra et al., 1992, Liebetanz et al., 2007).

Die MPTP- Läsion hatte einen subklinischen Effekt. Ausbleibende Veränderungen der zellulären Plastizität durch physiologische Stimuli bei Dopamindepletion können demnach nicht darauf zurückgeführt werden, dass die Versuchstiere des MPTP- Parkinsonmodells hypokinetisch gewesen wären und das Laufrad weniger genutzt hätten. Ob es durch das verwendete MPTP- Modell zu mildereren motorischen Defiziten, die durch Laufradaktivität nicht messbar sind, oder kognitiven und psychischen Veränderungen kommt, die das Verhalten in reizreicher Umgebung möglicherweise beeinflussen, wird in Zukunft untersucht werden müssen. So wird diskutiert, ob Tests der Schwimmleistung, des Gleichgewichts, der Orientierung und der Kognition nach MPTP längerfristig verändert sein können, obwohl in der freiwilligen Laufradstrecke keine Unterschiede detektierbar sind (Vuckovic et al., 2008, Gorton et al., 2010).

5.2 Interpretationen der Ergebnisse

5.2.1 Dopaminerge Neurone

5.2.1.1 Reduktion dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) durch MPTP

Tyrosinhydroxylase (TH) ist ein Enzym, welches in monoaminergen Neuronen exprimiert wird und die Dehydratation der Aminosäure L-Tyrosin zu L-Dopa katalysiert. Die hochsignifikante Verminderung der Zahl TH- immunreaktiver Zellen in der SNpc um 48,8 % (+/- 4,2%) nach systemischer MPTP- Gabe entspricht den Angaben zur Läsionsrate in der Literatur bei ähnlichen Injektionsschemata (Sedelis et al., 2001, Jackson- Lewis und Przedborski, 2007). Dies zeigt, dass das verwendete Injektionsschema bei adulten, weiblichen C57/BL 6 Mäusen eine probate Variante des etablierten subakuten MPTP- Modells bei männlichen Mäusen darstellt. Die Läsion blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum apparent.

Die statistische Analyse zeigte allerdings einen signifikanten Anstieg der Zahl dopaminerger Neurone über die vier untersuchten Zeitpunkte. Der negative Interaktionseffekt ließ keine Unterscheide zwischen gesunden- und MPTP- behandelten Tieren erkennen.

Aus anderen Studien ist bekannt, dass sich im akuten- und subakuten MPTP- Modell einige Parameter der Dopamindepletion, wie die striatale Dopaminkonzentration, der striatale TH- Gehalt und die Dichte striataler TH- positiver Fasern über die Zeit erholen (Ricaurte et al., 1987, Mitsumoto et al., 1998, Jakowec et al., 2004, Höglinger et al., 2004).

Anhand der Zahl nigraler TH- positiver Zellen konnte die Regeneration dopaminerger Neurone bisher nicht gezeigt werden, wobei dies auch kaum über längere Zeiträume untersucht wurde. Bei Mitsumoto (1998) zeigte sich 24 Tage nach MPTP- Applikation (4x 20mg/kg alle 2h) keine Erholung der Zahl TH- positiver Zellen, bei Jakowec (2004) war, bei gleichem MPTP- Schema, nach einem Monat keine veränderte Zellzahl detektierbar. Die Gruppe um Laloux (2008) fand auch 60 Tage nach MPTP- Applikation (5x 25mg/kg über 5d) konstant verminderte Zahlen der TH- immunreaktiven Zellen.

Der leichte Anstieg der Zahl dopaminerger Neurone in vorliegender Untersuchung kann sicher nicht auf zellproliferative Prozesse im Sinne von dopaminerger Neurogenese zurückgeführt werden, da hier nie eine Kolo-kalisation von BrdU und TH, noch irgendeines anderen neuronalen Markers in der SN gefunden wurde. In der jüngeren Literatur wird diese Meinung ebenfalls vertreten (Goldberg et al., 2011), nachdem es

zuvor kontroverse Berichte über dopaminerge Neurogenese in der SN gab (Zhao et al., 2003, Shan et al., 2006).

Denkbar ist eine toxische Schädigung und funktionelle Hemmung der dopaminergen Neurone in MPTP- Versuchstieren, mit Verminderung der nigralen Expression von TH und späterer Regeneration und Wiedererlangen der TH- Immunreaktivität, parallel zur Erholung der TH- Expression in nigrostriatalen Fasern im Striatum. Dort kam es in einer Untersuchung zwischen dem 60. und 90. Tag nach MPTP- Applikation zu einem Anstieg der Dichte TH- positiver Fasern (Jakowec et al., 2004). Es wird vermutet, dass das Ausmaß der Regeneration des striatalen TH- Proteingehalts und der Dopaminsynthese vom Grad der vorherigen Schädigung dopaminergen Neurone abhängt. Je ausgeprägter die Läsion, desto später und schwächer ist der regenerative Effekt (Bézard et al., 2000, Jakowec et al. 2004). Der gleiche Erholungseffekt darf für die nigrale TH- Expression angenommen werden, da es sich um dieselben Neurone handelt.

5.2.1.2 Keine Beeinflussung von dopaminergen Neuronen durch Levodopa und physiologische Stimuli

Die L- Dopa Medikation über 10 Tage (täglich einmal L- Dopa, 20mg/kg KG + Benserazid 5mg/kg/KG) hatte keinen Einfluss auf die TH- Expression.

In der Literatur gibt es Angaben zu möglichen toxischen Effekten durch erhöhten oxidativen Stress bei L-Dopa- Therapie (Melamed et al., 1998), aber ebenfalls Beschreibungen neuroprotektiver Effekte auf dopaminerge Neuronen (Datla et al., 2001). Die meisten Studien beziehen sich auf Langzeitwirkungen bei Wochen oder Monate dauernder Behandlung und hohen Dosen, wobei dann der neuroprotektive Effekt zu überwiegen scheint (Datla et al., 2001).

Die hier beobachtete unveränderte nigrale TH- Expression bei niedrigen L- Dopa Dosen bei kurzer Anwendung, die die MPTP- induzierten Dopamindepletion ausgleichen sollten, ohne Dyskinesien auszulösen, ist daher mit den genannten, in der Literatur wiedergegebenen Ergebnissen gut vereinbar.

RUN und ENR veränderten die Zahl TH- positiver Zellen weder in gesunden- noch in MPTP- Tieren. Ein präventiver Effekt auf TH- Zellverlust durch dreimonatige physische Aktivität im Laufrad vor akuter MPTP- Behandlung ist bekannt (Gerecke et al., 2010). Ebenso wirkt eine reizreiche Umgebung präventiv neuroprotektiv (Bézard et al., 2003).

Jüngere Untersuchungen an einem chronischen MPTP- Modell zeigten, dass ein protektiver Effekt auf das Überleben dopaminerger Zellen durch erzwungene physische Aktivität auch auftritt, wenn eine Woche vor MPTP- Gabe (15mg/kg KG alle dreieinhalb Tage über fünf Wochen) mit Laufbandtraining begonnen wurde (Lau et al., 2011). Allerdings wurde dort die Aktivität während der 5- wöchigen MPTP- Applikation und in den folgenden 12 Wochen weiter angewandt. Auf Grund jenes Studiendesigns ist also nicht zu unterscheiden, ob der protektive Effekt auf dopaminerge Neuronen durch die vorherige Aktivität, die Möglichkeit der Regeneration der Neurone während der langen MPTP- freien Intervalle im Applikationszeitraum, oder durch regenerative Prozesse nach Abschluss der Dopamindepletion bedingt war.

Es existiert nur ein Bericht über einen signifikanten ($p= 0,04$) Anstieg der Zellzahl dopaminerger Neurone durch physische Aktivität (erzwungenes Laufbandtraining, täglich 1 Stunde über 3 Wochen) nach Abschluss der MPTP- Applikation (7x 30 mg/kg über 7 Tage) (Smith et al., 2011). Dem gegenüber stehen mehrere Untersuchungen, die keinen Effekt von physischer Aktivität auf die TH- Zellzahl bei MPTP- behandelten Mäusen nach Abschluss der Depletion dopaminerger Neurone feststellen konnten (Fisher et al., 2004, Pothakos et al., 2009). Einmal wird von einer Verminderung des striatalen Dopamintransporters bei gleichbleibender nigraler TH- Zellzahl durch physische Aktivität berichtet (Petzinger et al., 2007). Die verminderte Expression des Dopamintransporters wurde dort als kompensatorischer Vorgang interpretiert, wodurch möglicherweise eine erhöhte synaptische Verfügbarkeit bei absolut vermindertem Dopamingehalt erreicht werden kann.

Bei der Vielzahl von verwendeten MPTP- Modellen, freiwilliger und erzwungener Aktivität auf Laufrädern, oder -bändern ist der Vergleich, der voneinander abweichenden Ergebnisse erschwert.

In der Zusammenschau der hier präsentierten Ergebnisse mit der Literatur, lässt sich jedoch erkennen, dass im akuten- und subakuten MPTP- Modell freiwillige Laufradaktivität nach Abschluss der MPTP- Behandlung zu keiner Erhöhung der Zahl nigraler TH- positiver Zellen führt. Einzige Ausnahme ist die Untersuchung von Smith, die sich hinsichtlich des experimentellen Designs unterschied. Die in einigen experimentellen Studien gezeigten klinischen Verbesserungen von parkinsonoiden Mäusen können eventuell auf Mechanismen zurückgeführt werden, die die synaptische Dopaminverfügbarkeit im Striatum erhöhen, obwohl die TH- Expression nigrostriataler dopaminerger Neuronen vermindert ist (Petzinger et al., 2007). Als molekulare

Mechanismen hierfür werden Neurotrophine diskutiert, die die synaptische Plastizität und die Neurotransmission beeinflussen könnten (Petzinger et al., 2007).

Auch kardiovaskuläre und muskuläre Trainingseffekten könnten eine Rolle spielen.

5.2.2 Zellproliferation in der Substantia nigra

5.2.2.1 Effekte von MPTP und L-Dopa auf die Zellproliferation

In der SVZ der Seitenventrikel und der SGZ des Hippokampus ruft eine Dopamindepletion mittels MPTP- Behandlung eine Reduktion der Zahl neuronaler Vorläufer hervor (Höglinger et al., 2004). Über dopaminerge Projektionen sind diese Regionen mit den dopaminergen Neuronen der SNpc verbunden (Freundlieb et al., 2006). In einer experimentellen Studie zur SN im 6- OHDA Modell der Ratte, zeigte sich vier und sieben Wochen nach Läsion nigraler dopaminerge Neurone keine Veränderung der nigralen Gesamtzellproliferation und NG2- Zellproliferation, aber eine verminderte Proliferation astrozytärer- und mikroglialer Zellen. Dies wurde als möglicher Hinweis auf eine selektive Regulation der zellulären nigralen Plastizität durch Dopamin gesehen (Steiner et al., 2006a).

In der vorliegenden experimentellen Untersuchung der SN der adulten Maus, war in der akuten Phase nach MPTP- Applikation (nach 3 Tagen) eine signifikante Erhöhung der Zahl BrdU- markierter, also im ersten Untersuchungszeitraum neugeborener Zellen, zu beobachten. Daraufhin fiel die Zahl neu gebildeter Zellen auf das Niveau gesunder Kontrolltiere ab, so, dass keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen gesunden und dopamindepletierten Tieren bestanden. Dies entspricht den Ergebnissen von Steiner et al. (2006a) in der Ratte und wird von uns als akute proliferative Reaktion auf die Noxe MPTP gewertet (s.u.). Wie oben (s. 5.1.6.) angegeben, fand unsere Arbeitsgruppe bei einer anatomisch-lokalisatorischen Differenzierung der detektierten Zellen zwischen SNpc und SNpc eine gleichartige Entwicklung der Zahl BrdU- markierter Zellen in beiden Unterregionen der SN (Klaissle et al., 2012).

Über die Zeit war eine Verminderung der detektierbaren BrdU- positiven Zellen innerhalb MPTP- behandelter Versuchsgruppen festzustellen, während die Zahl BrdU- markierter Zellen in gesunden Tieren gleich blieb. Da der Rückgang der neugebildeten Zellen in MPTP- Versuchsgruppen auch zu den spätesten Untersuchungszeitpunkten apparent war und die BrdU- Zellzahl unter das Niveau gesunder Kontrollen abfiel, handelt es sich nicht nur um eine bloße Nivellierung des initialen Proliferationsschubes.

Vielmehr werten wir dies als Hinweis auf ein verringertes langfristiges Überleben BrdU markierter nigraler Zellen im MPTP- Mausmodell, aufgrund des Mangels von Dopamin in der gesamten SN. Dies würde den Untersuchungsergebnissen zum verminderten Überleben von proliferierten Zellen im Hippokampus bei Dopamindepletion in Parkinsonmodell der Maus entsprechen (Höglinger et al., 2004).

Aufgrund der dichten dopaminergen Innervation der SNpr durch Afferenzen aus der angrenzenden SNpc (Zhou und Lee, 2011) erscheint plausibel, dass auch die Pars reticulata betroffen ist.

Passend zu dieser Hypothese eines nigralen proliferations- und überlebensfördernden Effekts von Dopamin, erhöhte die Behandlung mit L-Dopa über 10 Tage in dopamindepletierten Mäusen die Zahl neugebildeter Zellen. Gesunde Tiere, mit intaktem dopaminergem System, profitieren hinsichtlich der nigralen Proliferation nicht von der Gabe von L- Dopa (vgl. **Abb. 4.6**).

In der bereits genannten Publikation unserer Arbeitsgruppe (Klaissle et al., 2012) zeigte sich hierbei ein Unterschied zwischen SNpc und SNpr. Nur in der Pars reticulata der SN war in dopamindepletierten und dann dopaminsubstituierten Mäusen eine Erhöhung der proliferierten Zellen festzustellen. Möglicherweise ist der Effekt der Dopaminsubstitution auf Proliferation und Überleben also im Zielbereich der nigralen Efferenzen ausgeprägter als in der SNpc selbst (vgl. Höglinger et al., 2004).

5.2.2.2 Physiologische Stimuli

Ein proliferationsfördernder Effekt von freiwilliger physischer Aktivität und reizreicher Umgebung auf die Zellen der SN ist aus Untersuchungen an adulten Ratten bekannt (Steiner et al., 2006a). In den hier untersuchten gesunden Mäusen zeigte sich ein ähnlicher Effekt. RUN führte zu erhöhten Zellzahlen gegenüber STAN, wobei dieser Unterschied nur nach 10 und 28 Tagen statistisch signifikant war. ENR führte, ebenfalls nach 10 und 28 Tagen, zu einer noch deutlicheren Erhöhung der Zahl neugebildeter Zellen in der SN gesunder Tiere (vgl. **Abb. 4.19**). Das heißt, beide verwendeten physiologischen Stimuli förderten die Proliferation nigraler Zellen, die reizreiche Umgebung hatte dabei einen größeren Effekt, als alleinige physische Aktivität im Laufrad. Aus der SGZ des Gyrus dentatus ist bekannt, dass physische Aktivität im Laufrad auf die Proliferation neuronaler Vorläufer wirkt (van Praag et al., 1999), während eine reizreiche Umgebung, neben einem proproliferativen Effekt, zusätzlich das Überleben der Vorläuferzellen fördert (Kempermann et al., 1997, Kronenberg et al.,

2003). Derartige, selektive Effekte durch die physiologischen Stimuli konnten in vorliegender Studie auf die Zellen der SN nicht festgestellt werden. Jedoch scheint eine reizreiche Umgebung, unabhängig von den Untersuchungszeitpunkten, einen stärker ausgeprägten Effekt auf die nigrale Proliferation zu haben, als freiwillige Laufradaktivität.

5.2.2.3 Physiologische Stimuli, MPTP und L- Dopa

Bemerkenswerterweise blieben die proliferationsfördernden Effekte der physiologischen Reize bei RUN und ENR in MPTP- Tieren aus. Zu keinem Zeitpunkt veränderten physiologische Stimuli die Zahl proliferierter, nigraler Zellen bei Dopamindepletion durch MPTP. Ein intaktes nigrales dopaminerges System scheint also Voraussetzung für den Effekt physiologischer Stimuli auf die nigrale zelluläre Plastizität zu sein. Dies wurde weiter bestätigt, da die Behandlung von MPTP- Versuchsgruppen mit L-Dopa die Effekte von RUN und ENR wiederherstellte und zu einer vergleichbaren Erhöhung BrdU- markierter nigraler Zellen, wie bei gesunden Tieren führte (vgl. **Abb. 4.20**). Es wird diskutiert, ob physiologische Stimuli im MPTP- Modell den synaptischen Dopaminspiegel im Striatum erhöhen (Gorton et al., 2010). Als Mechanismus kommt die Verminderung des Dopamintransporters in Betracht, wodurch die Wiederaufnahme von Dopamin in präsynaptische Nervenendigungen gehemmt würde und der striatale Dopaminspiegel ansteigt (Petzinger et al., 2007). Eventuell kommt es dementsprechend zu einer Verschiebung der nigrostriatalen Dopaminverfügbarkeit von nigral nach striatal.

Der verminderte Effekt der freiwilligen Laufradaktivität bei Mäusen, die dem MPTP- Parkinsonmodell zugeordnet waren, kann nicht darauf zurückgeführt werden, dass die Tiere weniger physisch aktiv gewesen wären (s.o.). Sie legten trotz MPTP die gleiche Strecke im Laufrad zurück, wie gesunde Tiere. Dies legt nahe, dass die Ursache für die unterschiedliche Wirksamkeit der physiologischen Reize vom Zustand des nigralen dopaminergen Systems abhängt. Ob das Verhalten der Tiere in reizreicher Umgebung durch MPTP verändert war, wurde hier nicht untersucht. Derartige Veränderungen des Verhaltens und der Kognition sind für das akute MPTP- Parkinsonmodell beschrieben (4x 20mg MPTP/kg KG, alle 2h), wobei dort allerdings eine ausgeprägtere Läsion TH- positiver Neurone (58%), als im vorliegenden subakuten Modell (~48%) bestand (Vucković et al., 2008).

5.2.2.4 Proliferierte Zellpopulationen

Die Phänotypisierung der proliferierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ließ erkennen, dass der initiale Proliferationsschub in MPTP- Mäusen durch Neubildung Iba1-, NG2- und Nestin-GFP- positiver Zellen zustande kam.

Da es sich um einen kurzlebigen Effekt nach MPTP- Injektionen handelte, ist dieser als akute, post- toxische, inflammatorische Reaktion auf die Noxe MPTP zu interpretieren.

Ähnliche Effekte wurden in der Literatur bereits vielfach beschrieben (Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999, Chen et al., 2005, Barcia et al., 2009, Steiner et al., 2008, Park und Enikopolov, 2010, Yokoyama et al., 2010, Miller et al., 2011). Ab 10 Tage nach Versuchsbeginn waren auch zunehmend CNPase- positive proliferierte Zellen in der SN mikroskopisch zu observieren.

Mit größerem Abstand zur BrdU- Applikation nahm der Teil der Zellen zu, der durch BrdU markiert war, aber keine Immunreaktivität für die sonstigen verwendeten Marker zeigte und somit nicht charakterisierbar war. Aus den vereinzelt Zellen, die BrdU- markiert und ebenfalls aktivierte Caspase3- immunreaktiv waren, lässt sich nicht ableiten, dass ein größerer Anteil apoptotisch gewesen wäre. Die beobachtete Zunahme der nicht charakterisierbaren BrdU- positiven Zellen über die Zeit legt daher nahe, dass es sich um viable Zellen handelte, die mit zunehmendem Alter die Synthese derjenigen zelltypischen Proteine, die durch die verwendeten Antikörper markierbar waren, einstellten. Es wird in Zukunft noch untersucht werden müssen, aus welchen Zellen diese hervorgehen und wie sich weiter charakterisieren lassen.

5.2.2.5 Passagere mikrogliale Proliferation

Eine passagere inflammatorische Reaktion konnte durch den Nachweis proliferierter Iba1- positiver, mikroglialer Zellen in der SN von Versuchstieren, die MPTP erhalten hatten, gezeigt werden. Von post- mortem Untersuchungen an Parkinsonpatienten ist bekannt, dass sich in deren Gehirnen leicht erhöhte Zahlen aktivierter, mikroglialer Zellen befinden, weswegen auch eine inflammatorische Ursache des IPS diskutiert wird (McGeer und McGeer, 2008). Jene mikroglialen Zellzahlen sind jedoch im Vergleich zu entzündlichen ZNS- Erkrankungen wie Multiple Sklerose sehr niedrig und sprechen gegen eine bedeutsame inflammatorische Komponente beim IPS (McGeer und McGeer, 2008). Wir werten die hier beobachtete Proliferation von mikroglialen Zellen daher, und wegen der zeitlichen Begrenztheit des Phänomens, als akute Reaktion auf die Noxe MPTP. Es ist davon auszugehen, dass diese mikroglialen Zellen nach der

initialen Aktivierung entweder untergehen oder in nicht untersuchte Gebiete migrieren (Klaissle et al., 2012).

5.2.2.6 Einfluss der Stimuli auf NG2-Zellen und Oligodendrogenese

Zu allen Untersuchungszeitpunkten zeigten zahlreiche BrdU- positive Zellen eine Immunreaktivität für das Proteoglykan NG2, klassischerweise ein Marker für oligodentrozytäre Vorläuferzellen (OPCs, Polydendrozyten). NG2- positiven Zellen sind darüber hinaus bekannt für ihre Multifunktionalität, sie können *in-vitro* Eigenschaften multipotenter neuraler Stammzellen haben (Belachew et al, 2003, Aguirre et al, 2004, Nishiyama 2002, Hermann et al., 2006, 2010, Kitamura et al, 2010) und manche NG2-Zellen weisen Charakteristika auf, die eigentlich Neuronen eigen sind, wie synaptische Verbindungen, oder Spannungsabhängige Ionenkanäle (Barres et al., 1990, Bergles et al., 2000, Lin et al., 2005) weswegen sie auch als vierter Gliotyp bezeichnet werden (Peters, 2004). Die NG2- positiven Zellen wurden in gesunden Versuchsgruppen am stärksten von physiologischen Stimuli beeinflusst. Ähnliches zeigte sich bereits in anderen Untersuchungen an der Ratte (Steiner et al., 2006, 2008). Der ausbleibende proliferationsfördernde Effekt bei MPTP- Gabe legt die Hypothese nahe, dass das dopaminerge System intakt sein muss, damit RUN und ENR eine höhere NG2-Zellproliferation induzieren können. Da die Dopaminsubstitution mit L- Dopa, neben der zuvor erwähnten Gesamtproliferation in kranken Tieren, auch zu einem Anstieg der NG2- Proliferation führte und zudem den proliferationsfördernden Effekt von RUN und ENR wiederherstellte, wurde ein weiteres bestätigendes Indiz für die Abhängigkeit der NG2- Proliferation von Dopamin aufgezeigt (Klaissle et al., 2012).

In gesunden Versuchsgruppen hatte L- Dopa auch hier keinen zusätzlichen Effekt.

Die Dopaminsubstitution scheint also einmal direkt NG2- proliferationsfördernd zu sein und zudem einen permissiven Effekt für die physiologischen Stimuli RUN und ENR in der dopamindepletierten SN zu bewirken.

Die beobachtete lineare Verminderung der Zahl BrdU-markierter, NG2- positiver Zellen mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur BrdU-Applikation, könnte auf einen Differenzierungs- oder Entdifferenzierungsprozess, mit Verschwinden des unreifen Zellmarkers NG2, zurückgeführt werden. Um die Möglichkeit einer Differenzierung zu überprüfen, waren die BrdU- positiven Zellen auf die Expression von CNPase, einem Marker für reife Oligodentrozyten untersucht worden. Es zeigte sich eine Zunahme der

CNPase- Expression, bei zeitgleichem Verlust der NG2- Expression, als indirekter Hinweis auf zelluläre Reifeprozesse im Rahmen der Oligodendrogenese.

Die Beobachtung in gesunden Versuchsgruppen, dass proliferierte CNPase- positive Zellen zum frühesten Perfusions- und Untersuchungszeitpunkt nach drei Tagen nicht vorhanden waren, zum ersten Mal nach zehn Tagen detektiert wurden und deren Zahl über die Zeit zunahm, legt zudem einen Reifeprozess in der gesunden SN nahe. In der SN von MPTP- Tieren konnte zwar auch erstmals nach zehn Tagen CNPase kolokalisiert mit BrdU gefunden werden, aber die Zahl reifer Oligodendrozyten erhöhte sich nicht weiter.

Wir nehmen daher einen gestörten Reifungsprozess der Oligodendrozyten bei Dopamindepletion durch MPTP an. Eine schädigende Wirkung von MPTP auf reife striatale Oligodendrozyten konnte bereits die Forschergruppe um Tagaki (2007) im MPTP- Mausmodell, anhand der verminderten Zahl CNPase- positiver Zellen nach Läsion aufzeigen.

Die Oligodendrogenese in der gesunden adulten SN hat am Gesamtzellumsatz vergleichsweise geringen Anteil. Chen schätzte in einer kleinen Studie an Ratten den Anteil oligodendrozytärer Zellen an allen nigral neugebildeten Zellen auf 16% (Chen et al., 2005). Die Bedeutung der Rolle der Oligodendrozyten bei der Pathogenese des Morbus Parkinson wird gering eingeschätzt und wurde daher bisher wenig beachtet (McGeer und McGeer 2008). Vereinzelt Hinweise auf Beteiligung von Oligodendrozyten bei IPS gibt es jedoch. Wakabayashi konnte α - Synuclein- haltige Einschlusskörperchen, ähnlich den neuronalen Lewy- Körperchen, in nigralen Oligodendrozyten von post- mortem Parkinsonpatienten nachweisen, die dort als Zeichen degenerativer glialer Prozesse gewertet wurden (Wakabayashi et al., 2000). Über die mögliche funktionelle Bedeutung von Oligodendrozyten bei IPS konnte keine Aussage in der Literatur gefunden werden.

Die Zahl neugebildeter, reifer Oligodendrozyten in der SN wurde von der Substitution von L- Dopa über 10 Tage, oder physiologischen Stimuli nicht beeinflusst. Da ein gestörter Reifungsprozess erst in der späten Versuchsphase (nach 28 und 70 Tagen) sichtbar wurde, könnten längerfristige L-Dopa- Therapiemodelle in Zukunft möglicherweise Erkenntnisse über spätere Effekte der Dopaminsubstitution auf die Oligodendrogenese erbringen.

Es wurde bereits postuliert, dass NG2- Zellen im ZNS eine heterogene Population darstellen (Trotter et al., 2010). Die Feststellung, dass physiologische Stimuli Proliferation und Überleben NG2-positiver Zellen in der SN förderten, aber keine Auswirkung auf die CNPase- positiven Zellen hatten, die sich aus NG2- Zellen entwickeln, spricht dafür, dass es sich auch in der SN um keine homogene Zellpopulation handelt. Scheinbar reagiert eine Subpopulation von NG2- Zellen selektiv auf physiologische Stimuli, die sich nicht zu Oligodendrozyten differenzieren. Aus vorherigen Untersuchungen ist bekannt, dass eine Korrelation zwischen verbesserten motorischen Fähigkeiten durch physiologische Stimuli und verstärkter Bildung NG2-positiver Zellen besteht (Steiner et al., 2006a). Die Untersuchung dieser nigralen Zellpopulation und ihrer funktioneller Bedeutung könnte in Zukunft bedeutsam für die Einschätzung der regenerativen Möglichkeiten der SN, bei dopaminergem Zelluntergang im Rahmen von Morbus Parkinson sein. Es wurde gezeigt, dass NG2- Zellen in engem Kontakt mit Neuronen stehen, GABA (γ -Aminobuttersäure)-Rezeptoren exprimieren und es wird diskutiert ob NG2- Zellen das Neutrophin BDNF freisetzen (Trotter et al., 2010). Dies könnte einen möglichen protektiven- oder regenerativen Wirkungsmechanismus der NG2- Zellen auf Neurone darstellen. Auch eine auf Sekretion protektiver Faktoren beruhende regulatorische Rolle der Oligodendrozyten in der geschädigten Substantia nigra wird diskutiert (Klaissle et al., 2012).

5.2.2.7 Proliferation neuraler Vorläuferzellen

Wie in der Methodenkritik aufgeführt, ist neben der Nestin- Expression in neuralen Vorläuferzellen nach Nervenzellschädigung auch eine Expression in nicht- neuralen Zellen, wie Endothelzellen, möglich (Gilyarov, 2008). Es wäre also prinzipiell denkbar, dass der Anstieg der Nestin-GFP- markierten, proliferierten Zellen in der Phase nach MPTP- Injektion auf nicht- neurale Zellen zurückzuführen ist.

Dagegen spricht jedoch, dass kein unmittelbarer Kontakt zu Kapillaren, wie es bei Endothelzellen zu erwarten wäre, mikroskopisch festgestellt werden konnte.

Es ist bisher nicht beschrieben worden, dass nicht- neurale Zellen, z.B. Endothelzellen, in adulten Organismen NG2 exprimieren (Nishiyama et al., 2009).

Käme es zu einer Proliferation nicht- neuraler Zellen, würde der Anteil gleichzeitig NG2- und Nestin-GFP- positiver-, also neuraler Zellen sinken. Da der Anteil dieser Zellen nach MPTP- Behandlung jedoch unverändert bei etwa der Hälfte aller GFP- positiver

Zellen blieb und keine Koexpression mit dem endothelialen Zellmarker von- Willebrand-Faktor zu detektieren war, interpretieren wir die Detektion von GFP als Charakteristikum neuraler Vorläuferzellen.

Die Koexpression von NG2, bei einem Teil dieser Zellen, kann als Hinweis auf ein Differenzierungspotential in Richtung der oligodendrozytären Zelllinie gewertet werden, schließt aber auch ein neuronales Potential keinesfalls aus (s.o., Nishiyama et al., 2009). Dennoch ist denkbar, dass ein Teil der nigralen GFP- positiven Zellen nicht-neuralen Ursprungs ist und Proteine synthetisiert, die mit den hier angewandten immunologischen Zellmarkern nicht zu erfassen sind.

5.2.2.8 Zu keinem Zeitpunkt Neurogenese detektierbar

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Studien zur Zellproliferation im Hippokampus, konnten wir in der Substantia nigra *in vivo* keine Neurogenese feststellen, unabhängig vom Parkinsonmodell oder der L- Dopa Behandlung. Auch physiologische Stimuli sind, anders als im Hippokampus, nicht als neurogener Stimulus ausreichend.

Dies entspricht den Daten zahlreicher Untersuchungen zum neurogenen Potential der SN (Frielingsdorf et al., 2004, Cooper und Isacson 2004, Steiner et al., 2006a, Höglinger et al., 2007, Hermann et al., 2009). Die wenigen Hinweise auf orthotope neuronale Regeneration in der SN nach MPTP- Läsion (Zhao et al., 2003, Shan et al., 2006) konnten nicht reproduziert werden.

Bei der Studie von Zhao (2003) wurden höhere BrdU- Dosen verwendet, die die Inkorporation von BrdU in geschädigte, oder apoptotische Neurone als mögliche Erklärung für die Kolokalisation von BrdU und neuronalen Markern erscheinen lässt (Frielingsdorf et al., 2004). Falls es in der SN neurogenes Potential *in vivo* geben sollte, reichen die hier verwendeten pathologischen und physiologischen Stimuli nicht aus, um neuronale Vorläufer zur Proliferation anzuregen, oder die Differenzierung in reife Neuronen zu fördern. Am ehesten ist dies auf Unterschiede im Mikromilieu gegenüber SGZ und SVZ zurückzuführen (Borta und Höglinger, 2007). Worin diese lokalen Unterschiede genau bestehen und wie sie reguliert werden, wird in Zukunft erforscht werden müssen.

Die zellkulturellen Daten der vorliegenden Arbeit lassen auch das intrinsische neuronale Potential der SN *in vitro* gering erscheinen. In der Sphärenkultur zeigten sich zwar sehr vereinzelt Nestin-GFP- positive, Kolonie- formende Zellen. Doch diese ließen sich nicht

weiter expandieren. Eine Charakterisierung des neuralen, oder neuronalen Potentials *in vitro* war somit nicht möglich.

Versuchen in vorherigen experimentellen Untersuchungen, neuronale Vorläufer aus der SN zu isolieren, verliefen ebenfalls erfolglos (Hermann et al., 2009). Nur die Gruppe um Lie (2002) isolierte neurale, *in vivo* proliferierte Vorläuferzellen aus der SN und konnte, nach Kultivierung *in vitro*, Marker aller neuralen Zelllinien, inklusiver neuronaler Marker, kolokalisiert mit den ehemals nigralen Zellen finden.

Hermann (2009) gab jedoch zu bedenken, dass bei der Mikrodissektion des Gewebes, aufgrund der räumlichen Begrenztheit im Mittelhirn der Maus, die Wahrscheinlichkeit der „Verunreinigung“ mit Gewebe aus angrenzenden Hirnregionen hoch ist. Namentlich die periventriculäre Region, um den Aquaeductus mesencephali und den dritten Ventrikel, enthält Progenitoren mit neuronalem Potential, welches sich *in vitro* zu entfalten vermag (Hermann et al., 2006a). Diese Region käme aufgrund der anatomischen Nähe als Quellregion für „kontaminiertes“ Material in Frage.

Ogleich die erfolglose Kultivierung von differenzierungsfähigen Neurosphären aus der SN in der vorliegenden, und vorherigen Arbeit nicht gelang, kann neurogenes Potential der SN nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Bis zur verlässlichen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Lie (2002), kann jedoch keine sichere Aussage zum Vorhandensein eines endogenen neuronalen Potentials der SN gemacht werden.

Als Zellen mit regenerativem Potential und möglicherweise neuronalen Eigenschaften kommen am ehesten die NG2- positiven Zellen in Frage.

Zellkulturelle Studien, mit Fokus auf diesen Zelltyp, zur Eruierung der neuronalen Differenzierbarkeit, könnten einen wichtigen Schritt für das Verständnis des restaurativen Potentials der SN liefern.

5.3 Klinische Relevanz

Die hier erbrachten Erkenntnisse tragen zum Verständnis der zellulären Plastizität der SN, ihrer Regulation durch physiologische Reize und der Bedeutung eines intakten dopaminergen Systems für die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und das Zellüberleben bei.

In klinischen Studien zeigte sich, dass der Effekt von L-Dopa auf das motorische Leistungsvermögen, ermittelt anhand des motorischen Abschnitts des UPDRS- Tests, einen stärkeren Effekt hat, wenn die Patienten sich nach Medikamenteneinnahme auf

einem Ergometer sportlich betätigten (Muhlack et al., 2007). Es wird dort diskutiert, ob sich durch Freisetzung von Endorphinen eine Aktivierung postsynaptischer Dopaminrezeptoren ereignet, oder die Endorphine eine erhöhte Dopaminfreisetzung bewirken. Auch eine verbesserte Neurotransmission mit Erhöhung des synaptischen Dopamingehalts durch verminderte präsynaptische Dopamin- Wiederaufnahme wird diskutiert (Petzinger et al., 2007)

Es wäre denkbar, dass neben derartigen Effekten auch regenerative Mechanismen auf zellulärer Ebene erfolgen, wobei jedoch offenbar keine Neurogenese induziert werden kann. Ob die in vorliegender Untersuchung proliferierten, nigralen NG2- positiven Zellen, die durch reizreiche Umgebung bei Vorhandensein von Dopamin stimuliert wurden, tatsächlich eine relevante Funktion haben, wird in Zukunft untersucht werden müssen. Möglicherweise können NG2- positive Zellen über Neutrophine das Mikromilieu beeinflussen und so protektive und restaurative Funktionen erfüllen (Lau et al., 2011, Klaisle et al., 2012, Steiner, 2012).

Aus klinischen Untersuchungen beim Menschen weiß man, dass Physiotherapie bei Parkinsonpatienten die Mobilität steigert, die Verrichtung der Aktivitäten des täglichen Lebens erleichtert und die Motorik verbessert (de Goede et al., 2001). Die Erkenntnisse dieser tierexperimentellen Arbeit können nur bedingt auf die klinische Situation bei Patienten mit IPS übertragen werden. Dennoch können die Daten vorliegender Arbeit als ein Indiz dafür gewertet werden, dass bei physischer Aktivität neben peripheren Veränderungen, wie verbesserter Muskelkraft und kardiovaskulärem Trainingseffekt, auch zentralnervöse, nigrale Veränderungen auf zellulärer Ebene einer Rolle für klinische Verbesserungen spielen könnten (Steiner, 2012). Da die zellulären nigralen Veränderungen im MPTP- Mausmodell besonders ausgeprägt bei L-Dopa- Therapie in Kombination mit physiologischen Stimuli waren und beim humanen Parkinsonpatienten L-Dopa- Therapie in Kombination mit ergometrischer Aktivität am effektivsten die Motorik verbessert (Muhlack et al., 2007), liegt die Hypothese nahe, dass die nigrale zelluläre Plastizität im adulten Organismus auch funktionell bedeutsam ist.

5.4 Zusammengefasste Ergebnisbeurteilung

In dieser Arbeit konnte Folgendes gezeigt werden:

1.) Die Dosis- und Injektionsfrequenzanpassung des subakuten MPTP- Parkinsonmodells an weibliche C 57/BL 6 Mäuse, führt zu einer zuverlässigen Läsion dopaminerger Neurone in der SNpc.

- 2.) Bei nigral proliferierenden Zellen handelt es sich zum Großteil um unreife und reife gliale Zellen, mikrogliale Zellen, sowie neurale Vorläuferzellen. Es verbleibt ein Anteil BrdU- markierter Zellen, die nicht immunotypisierbar sind und über deren Zuordnung zu einer Zelllinie und deren Differenzierung keine Aussage getroffen werden kann. Der Anteil dieser Zellen nimmt mit zeitlichem Abstand zur BrdU- Applikation zu.
- 3.) Bei einer nigralen Dopamindepletion durch MPTP im Parkinsonmodell der Maus kommt es in der SN temporär zu einem Proliferationsschub, der in erster Linie mikroglialer und neural- glialer Natur ist und am ehesten als reaktive Inflammation durch die Noxe MPTP zu werten ist.
- 4.) Die Viabilität neu gebildeter nigraler Zellen bei Dopamindepletion ist längerfristig vermindert. Ein intaktes nigrales dopaminerges System fördert hingegen das Überleben proliferierter Zellen. Insbesondere das Überleben neugebildeter Oligodendrozyten scheint von Dopamin abhängig zu sein. Nestin-GFP- positive neurale Vorläufer und Iba1- positive Mikroglia sind hingegen nicht beeinflusst.
- 5.) Durch physiologische Stimuli kommt es bei gesunden Mäusen zu einer Steigerung der Gesamtzahl neugebildeter nigraler Zellen, hervorgerufen durch selektive Proliferation bestimmter Zellpopulationen. Reizreiche Umgebung hat hierbei einen stärkeren Effekt als freiwillige physische Aktivität im Laufrad. Die Charakterisierung der von reizreicher Umgebung beeinflussten Zellen zeigte, dass es sich hierbei insbesondere um NG2- positive Zellen handelt.
- 6.) Bei Dopamindepletion durch MPTP zeigen physiologische Stimuli keine Wirkung auf die nigrale Zellproliferation, als Indiz für ein intaktes nigrales dopaminerges System, als Voraussetzung für einen proliferativen Effekt physiologischer Stimuli auf die SN. Durch Substitution von Dopamin kommt es zu einer Wiederherstellung des Effekts physiologischer Stimuli auf die nigrale zelluläre Plastizität, wobei wiederum NG2- positiven Zellen den hauptsächlich beeinflussten Zelltypus darstellen. Dies unterstützt die Annahme, dass physiologische Stimuli in der SN auf die zelluläre Plastizität, genauer auf NG2- positive Zellen, in Abhängigkeit von Dopamin wirken.
- 7.) *In vivo* finden sich, unabhängig von den jeweiligen Versuchsbedingungen, keine neugebildeten neuronalen Zellen in der SN. Ein endogenes neurogenes Potential der adulten SN konnte mittels der zellkulturellen Untersuchung *in vitro* nicht dargestellt werden konnte. Es fand sich somit kein Hinweis auf nigrale Neurogenese in adulten Versuchstieren.

6. Literaturverzeichnis

Aarsland D, Larsen JP, Lim NG, et al. Range of neuropsychiatric disturbances in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;67(4):492-496

Adler CH, Sethi KD, Hauser RA, et al.. Ropinirole for the treatment of early Parkinson's disease. The Ropinirole Study Group. *Neurology* 1997;49:393-399

Ahlskog JE.. Does vigorous exercise have a neuroprotective effect in Parkinson's Disease? *Neurology* 2011;77:288-294

Alonso G. Neuronal progenitor-like cells expressing polysialylated neural cell adhesion molecule are present on the ventricular surface of the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 1999;414(2):149-166

Aloisi F. Immune Function of Microglia. *Glia* 2001;36:165–179

Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 1962;135:1127-1128

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(4):287-293

Arai N, Misugi K, Goshima Y, Misu Y. Evaluation of MPTP- treated C57 black mouse model for parkinsonism. *Brain Res* 1990;515:57- 63

Arras, M. Wenn Tiere leiden - Einschätzung der Belastung bei Labormäusen. Habilitationsschrift, Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich. 2008.S.33

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8:963-970

Barres BA, Koroshetz WJ, Swartz KJ, Chun LL, Corey DP. Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. *Neuron* 1990;4:507-524

Baumann N, Pham- Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Phys Rev* 2001;81(2):871-927, S.875

Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The genetics of Parkinson's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010;23 (4): 228-42

Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE. Glutamergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 2000;405:187-191

Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K und Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 1973;20, 415-455

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000;3:1301-1306

Bezard E, Imbert C, Gross CE. Experimental models of Parkinson's disease: from the static to the dynamic. *Rev Neurosci* 1998;9: 71-90.

Bezard E, Gross CE, Fournier MC, Dovero S, Bloch B, Jaber M. Absence of MPTP induced neuronal cell death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol* 1999;155: 268-273

Bezard E, Dovero S, Imbert C, Boraud T, Gross CE. Spontaneous long-term compensatory dopaminergic sprouting in MPTP-treated mice. *Synapse* 2000;38:363–368

Bezard E, Dovero S, Belin D, et al. Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J Neurosci* 2003;23(35):10999-11007

Bongarzone ER, Howard SG, Schonmann V, Campagnoni AT. Identification of the dopamine D3 receptor in oligodendrocyte precursors: potential role in regulating differentiation and myelin formation. *J Neurosci* 1998;18:5344-5353

Borta A, Höglinger GU. Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem* 2007;100(3):587-595

Bourne J. Handbuch I immunhistochemischer Färbemethoden. *Dako Diagnostika GmbH, Hamburg* 2000;S. 7-13

Bowers JM, Waddell J, McCarthy MM. A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. *Biol Sex Differ* 2010;22;1(1):8

Brandt MD, Maass A, Kempermann G, Storch A. Physical exercise increases Notch activity, proliferation and cell cycle exit of type-3 progenitor cells in adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2010;32(8):1256-64

Bull ND, Bartlett PF. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J Neurosci* 2005;25(47):10815-21

Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2001;435(4):406-417

Carpenter MB, Nakano K, Kim R. Nigrothalamic projections in the monkey demonstrated by autoradiographic techniques. *J Comp Neurol* 1976;165(4):401-415

Chen Y, Ai Y, Slevin JR, Maley BE, Gash DM. 2005. Progenitor proliferation in the adult hippocampus and substantia nigra induced by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol* 196(1):87-95

Chia LG, Ni DR, Cheng LJ, Kuo JS, Cheng FC, Dryhurst G. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 5,7-dihydroxytryptamine on the locomotor activity and striatal amines in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett* 1996;218:67-71

Chiba K, Trevor AJ, Castagnoli N Jr. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine MPTP by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120: 574-578

Chiueh CC, Markey SP, Burns RS, Johannessen JN, Jacobowitz DM, Kopin IJ. Neurochemical and behavioral effects of MPTP in rat, guinea pig and monkey. *Psychopharmac Bull* 1984;20:548-553

Cooke SF, Bliss TV. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 2006;129: 1659-1673

Cooper O, Isacson O. Intrastratial transforming growth factor alpha delivery to a model of Parkinson's disease induces proliferation and migration of endogenous adult neural progenitor cells without differentiation into dopaminergic neurons. *J Neurosci* 2004;24(41):8924-8931

Cooper-Kuhn CM, Georg Kuhn H. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2002;134 (1-2):13-21

Crosby NJ, Deane KHO, Clarke CE. Amantadine for dyskinesia in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;2:CD003467

Cummins RA, Livesey PJ, Evans JGM. A developmental theory of environmental enrichment. *Science* 1977;197, 692-694

Datla KP, Blunt SB, Dexter DT. Chronic L-Dopa administration is not toxic to the remaining dopaminergic nigrostriatal neurons, but instead may promote their functional recovery, in rats with partial 6-OHDA or FeCl(3) nigrostriatal lesions. *Mov Disord* 2001;16(3):424-434

Davey GP, Clark JB. Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. *J Neurochem* 1996;66, 1617-1624

Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* 2010;10;66(5):646-661

de Goede CJ, Keus SH, Kwakkel G, Wagenaar RC. The effects of physical therapy in Parkinson's disease: a research synthesis. *Arch Phys Med Rehabil* 2001;82(4):509-515

Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, et al., German Parkinson Study Group, Neurostimulation Section. A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2006;355:896-908

Deuschl G. Parkinson's disease - the future of invasive therapy. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2010;78 (1):16-19

Diener HC, Putzki N, Berlit P. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; 4. überarbeitete Auflage. 2008;ISBN 978 3 13 132414 6. Georg Thieme Verlag Stuttgart

Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Gotz M. Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 2008;28(41):10434-10442

Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999;97(6):703-716

Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:543-550

Doorn KJ, Lucassen PJ, Boddeke HW, Prins M, Berendse HW, Drukarch B, van Dam AM. Emerging roles of microglial activation and non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2012;98(2):222-38

Eggert K, Oertel W, Reichmann H et al. Leitlinien: Parkinson-Syndrome – Diagnostik und Therapie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN).2012; <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/030-010.html>. Abrufdatum 29.03.2013.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998;4:1313-1317

Fabel K, Wolf SA, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Kempermann G. Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Front Neurosci* 2009;3:50

Fan D, Rossi MA, Yin HH. Mechanisms of action selection and timing in substantia nigra neurons. *J Neurosci* 2012;32(16): 5534-5548

Farrer MJ. Genetics of Parkinson's disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet.* 2006;7 (4):306-318

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991;114 (5), 2283-2301

Fisher BE, Petzinger GM, Nixon K, et al., Exercise- induced behavioral recovery and neuroplasticity in the MPTP- lesioned mouse basal ganglia. *J Neurosci Res* 2004;77(3):378-390

Franklin RJM, Bayley SA, Milner R, Ffrench-Constant C, Blakemore WF. Differentiation of the O-2A progenitor cell line CG-4 into oligodendrocytes and astrocytes following transplantation into glia-deficient areas of CNS white matter. *Glia* 1995;13(1): 39-44

Fredriksson A, Plaznik A, Sundström E, Jonsson G, Archer T. MPTP- induced hypoactivity in mice: reversal by L- dopa. *Pharmacol Toxicol* 1990;67(4):295-301

Fredriksson A, Stigsdotter IM, Hurtig A, Ewalds- Kvist B, Archer T. Running wheel activity restores MPTP- induced functional deficits. *J Neural Transm.* 2010; Sep 18

Freundlieb N, Francois C, Tandé D, Oertel EH, Hirsch EC, Höglinger GU. Dopaminergic substantia nigra neurons project topographically organized to the subventricular zone and stimulate precursor cell proliferation in aged primates. *J Neurosci* 2006;26(8):2321-2325

Frielingsdorf H, Schwarz K, Brundin P, Mohapel P. No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;101(27):10177-10182

Fuxe K, Manger P, Genedani S, Agnati L. The nigrostriatal DA pathway and Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2006;70:71-83

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287(5457):1433-1438

Galea LA, Spritzer MD, Barker JM, Pawluski JL. Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus* 2006;16(3):225-232

Galea LA, McEwen BS. Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult meadow voles. *Neuroscience* 1999;89(3):955-964

García AM. Expression von Glukokortikoid- und Mineralkortikoidrezeptoren auf neuronalen Vorläuferzellen im murinen Gyrus dentatus. Dissertation Charité-Universitätsmedizin Berlin, 2008;S.45

Gensert JM, Goldmann JE. In vivo characterization of endogenous proliferating cells in adult rat subcortical white matter. *Glia* 1996;17(1):39-51

Gerecke KM, Jiao Y, Pani A, Pagala V, Smeyne RJ. 2010;Exercise protects against MPTP- induced neurotoxicity in mice. *Brain Res* 1341: 72-83

Goldberg NR, Haack AK, Meshul CK. Enriched environment promotes similar neuronal and behavioral recovery in a young and aged mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2011;172:443-452

Golmohammadi MG, Blackmore DG, Large B, et al. Comparative analysis of the frequency and distribution of stem cells in the adult mouse brain. *Stem Cells* 2008;26(4):979-987

Goodwin VA, Richards SH, Taylor RS, Taylor AH, Campbell JL The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 2008;23(5):631-640

Gorton LM, Vuckovic MG, Vertelkina N, Petzinger GM, Jakowec MW, Wood RI. Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse. *Behav Brain Res* 2010;213(2):253-62

Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:10910-10917

- Gould E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* 2002;22:619-23
- Gilyarov AV. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol* 2008;38(2):165-169
- Hagg T. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci* 2005;28(11):589-95
- Hamre K, Tharp R, Poon K, Xiong XP, Smeyne RJ. Differential strain susceptibility following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration acts in an autosomal dominant fashion: quantitative analysis in seven strains of *Mus musculus*. *Brain Res* 1999;828:91-103
- Harms KJ, Dunaevsky A. Dendritic spine plasticity: looking beyond development. *Brain Res* 2007;12;1184:65-71
- Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of MPTP in mice. *Science* 1984;224:1451-1453
- Hermey, G. Zelluläre Neurobiologie. *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. Spektr Akad Verl Heidelb. 2010;S.81
- Hermann A, Maisel M, Wegener F, et al., Multipotent neural stem cells from the adult tegmentum with dopaminergic potential develop essential properties of functional neurons. *Stem Cells* 2006;24:949-964
- Hermann A, Maisel M, Liebau S, et al. Mesodermal cell types induce neurogenesis from adult human hippocampal progenitor cells. *J Neurochem* 2006;98:629-640
- Hermann A, Suess C, Fauser M, et al. Rostro-caudal gradual loss of cellular diversity within the periventricular regions of the ventricular system. *Stem Cells* 2009;27(4):928-941
- Hermann A, Brandt MD, Loewenbrück KF, Storch A. "Silenced" polydendrocytes: a new cell type within the oligodendrocyte progenitor cell population? *Cell Tissue Res* 2010;340(1):45-50
- Hirsch EC, Gabriel AM, Agid YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 1988;334: 345-347.
- Höglinger GU, Rizk P, Muriell MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation on Parkinson disease. *Nat Neurosci* 2004;7(7):726-735
- Höglinger GU, Oertel WH, Hirsch EC. The rotenone model of parkinsonism- the five years inspection. *J Neural Transm* 2006;70: 269-272
- Höglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, et al. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(9):3585–3590

Hsu SM, Raine MS, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981;75:816-821

Howard S, Landry C, Fisher R, Bezougliaia O, Handley V, Campagnoni A. Postnatal localization and morphogenesis of cells expressing the dopaminergic D2 receptor gene in the rat brain: expression in non-neuronal cells. *J Comp Neurol* 1998;391(1):87-98

Ilic D, Polak JM. Stem cells in regenerative medicine: introduction. *Br Med Bull* 2011;98:117-26. Epub May 11

Ives NJ, Stowe RL, Marro J, et al. Monoamine oxidase type B inhibitors in early Parkinson's disease: meta-analysis of 17 randomised trials involving 3525 patients. *Br Med J* 2004;329:593

Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6 tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 1995;4, 257-269

Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc* 2007;2(1):141-151

Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18 Suppl 1: S183-S185

Jakowec MW, Nixon K, Hogg E, McNeill T, Petzinger GM. Tyrosinhydroxylase and dopamine transporter expression following MPTP- induced neurodegeneration of the mouse nigrostriatal pathway. *J Neurosc Res* 2004;76: 539-550

Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism inducing neurotoxin MPTP: uptake of the metabolite MPP+ by dopamine neurons explain selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82, 2173-2177

Jellinger KA. Pathology of Parkinson's disease. Changes in other than the nigrostriatal pathway. *Molecular and Chemical Neuropathology* 1991;14:153-197.

Jellinger KA. Formation and development of lewy pathology: a critical update. *J Neurol* 2009;256(3):270-279

Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 1977;197(4308):1092-1094.

Kay JN, Blum M. Differential response of ventral midbrain and striatal progenitor cells to lesions of the nigrostriatal dopaminergic projection. *Dev Neurosci* 2000;22(1-2):56-67

Kayser K, Gabius HJ, Gabius S. Biotinylierte Liganden in der Rezeptorlokalisierung. *Zentralbl Pathol* 1991;137:473-478

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997;386: 493-495

- Kempermann G. Why new neurons? Possible functions of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 2002;22:635-638
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 2004;27:447-452
- Kempermann G. New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat Rev Neurosci* 2012;13:727-736
- Kitamura Y, Inden M, Minamino H, Abe M, Takata K, Taniguchi T. The 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal neurodegeneration produces microglia-like NG2 glial cells in the rat substantia nigra. *Glia* 2010;58(14):1686-700
- Klaissle P, Lesemann A, Huehnchen P, Hermann A, Storch A, Steiner B. Physical activity and environmental enrichment regulate the generation of neural precursors in the adult mouse substantia nigra in a dopamine-dependent manner. *BMC Neurosci* 2012;13:132
- Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, et al. Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain. *Brain Res Protoc* 2004;13(1):45-52
- Koketsu D, Mikami A, Miyamoto Y, Hisatsune T. Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys. *J Neurosci* 2003;23:937-942
- Kondo T, Raff M. Chromatin remodeling and histone modification in the conversion of oligodendrocyte precursors to neural stem cells. *Genes Dev* 2000;18:2963-2972
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, et al. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 2003;467:455-463
- Kupsch A, Löschmann P-A, Sauer H et al. Do NMDA-receptor antagonists protect against MPTP-toxicity? Biochemical and immunocytochemical analyses in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1992;592:74-83
- Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M, Czlonkowski A, Clonkowska A. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol* 1999;156(1):50-61
- Lagace DC, Fischer SJ, Eisch AJ. Gender and endogenous levels do not influence adult hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 2007;17(3):175-180
- Laloux C, Derambure P, Kreisler A, et al. MPTP-treated mice: long-lasting loss of nigral TH-ir neurons but not paradoxical sleep alterations. *Exp Brain Res* 2008;186(4):635-42
- Langston JW. Chronic parkinsonism in humans due to a product of methamphetamine synthesis. *Science* 1983;219:979-980

Langston JW, Ballard PAJ. Parkinson's in a chemist working with MPTP. *N Engl J Med* 1983;309:310

Langston JW, Irwin I, Langston EB, DeLaynnay LE, Ricaurte GA. MPTP- induced parkinsonism in humans: A review of the syndrome and observations relating to the phenomenon of tardive toxicity. In: Markey SP, Castagnoli N jr, Trevor AJ, Kopin IJ MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. Orlando: Academic Press, 1986: 9- 21

Lau YS, Patki G, Das-Panja K, Le WD, Ahmad SO. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *Eur J Neurosci* 2011;33(7):1264-74

Lavoie B, Smith Y, Parent A. Dopaminergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 1989;289:36-52

Lees AJ. Unresolved issues relating to the shaking palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday. *Mov Disord* 2007;22 Suppl 17: 327-34

Lefkovits I, Waldmann H. Limiting dilution analysis of the cells of immune system I. The clonal basis of the immune response. *Immunology Today* 1984;5(9):265-268

Lendahl U, Zimmermann LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60(4):585-95

Leng A, Mura A, Hengerer B, et al. Effects of blocking the dopamine biosynthesis and of neurotoxic dopamine depletion with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on voluntary wheel running in mice. *Behavioural Brain Research* 2004;154:375–383

Levine CB, Fahrbach KR, Siderowf AD, Estok RP, Ludensky VM, Ross SD. Diagnosis and treatment of Parkinson's disease: a systematic review of the literature. *Evidence Report/Technology Assessment* 2003;57:1-306

Lie DC, Dziejczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 2002;22(15):6639-6649

Liebetanz D, Baier PC, Paulus W, Meuer K, Bähr M, Weishaupt JH. A highly sensitive automated complex running wheel test to detect latent motor deficits in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2007;205(1):207-13

Lin SC, Huck JH, Roberts JD, Macklin WB, Somogyi P, Bergles DE. Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum. *Neuron* 2005;46: 773-785

Linder JC, Klempfuss H, Groves PM. Acute ultrastructural and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mice. *Neurosci Lett* 1987;82:221-226

Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:2074-2077

McClung CA, Nestler EJ. Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology* 2008;33(1):3-17

McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis* 2002;10:119-127

McGeer PL, McGeer EG. Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008;23(4):474-483

McKay R. Stem Cells in the Central Nervous System, *Science* 1997;276: 66-71

Melamed E, Offen D, Shirvan A, Djaldetti R, Barzilai A, Ziv I. Levodopa toxicity and apoptosis. *Ann Neurol* 1998;44:149-154

Menn B, García-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzáles-Pérez O, Rowitch D, Álvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 2006;26(30):7907-7918

Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 2004;469: 311–324

Miller MW, Nowakowski RS. Use of bromodeoxyuridine- immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res* 1988;457:44-52

Miller JA, Trout BR, Sullivan KA, Bialecki RA, Roberts RA, Tjalkens RB. Low-dose 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine causes inflammatory activation of astrocytes in nuclear factor- κ B reporter mice prior to loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 2011;89(3):406-417

Mitra N, Mohanakumar KP, Ganguly DK. Dissociation of serotonergic and dopaminergic components in acute effects of 1-methyl-4-phenyl-,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Brain Res Bull* 1992;28(3):355-64

Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2005;28:223-250

Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 2000;95:425-432

Mitsumoto Y, Watanabe A, Mori A, Koga N. Spontaneous regeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons in MPTP-treated C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;30;248(3):660-663

Monif M, Burnstock G, Williams DA. Microglia: proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42(11):1753-1756

- Muhlack S, Welnic J, Woitalla D, Müller T. Exercise improves efficacy of levodopa in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008;22(3):427-430
- Muthane U, Ramsay KA, Jiang H, et al. Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. *Exp Neurol* 1994;126:195–204
- Nakajima W, Ishida A, Lange MS, et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci* 2001;20(21):7994-8004
- Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(1):9-22
- Oertel WH, Wolters E, Sampaio C, et al. Pergolide versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease patients: The PELMOPET study. *Mov Disord* 2006;21:343-353
- Ohtani N, Goto T, Waeber C, Bhide PG. Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *J Neurosci* 2003;23(7):2840-2850
- Palmer TD, Ray J, Gage FH. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 1995;6:474-486
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. Fibroblast Growth Factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 1999;19:8487-8497
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 2000;425:479-494
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein.. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 1997;17:3727-3738
- Park JH, Epikopolov G. Transient elevation of adult hippocampal neurogenesis after dopamine depletion. *Exp Neurol* 2010;222:267-276
- Parkinson, James. *An Essay on the shaking palsy*. Sherwood, Neely and Jones, Paternoster Row, London 1817
- Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 3rd Edition. Academic Press 2007
- Peters A. A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system. *J Neurocytol* 2004;33:345-357.

- Petzinger GM, Walsh JP, Akopian G, et al. Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the MPTP-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *J Neurosci* 2007;27(20):5291-5300
- Platel A, Strolin-Benedetti M, Guffroy C. MPTP-induced decrease in motor activity in two strains of mice: Its reversal by different monoamine oxidase inhibitors (MAOIs). In: Markey SP, Castagnoli N Jr., Trevor AJ, Kopin IJ, eds. *MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome*. Orlando: Academic Press 1986;S. 443-447
- Pollak P, Benabid AL, Gross C, Gao DM, Laurent A, Benazzouz A, Hoffmann D, Gentil M, Perret J. Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease. *Rev Neurol (Paris)* 1993;149(3):175-6
- Pothakos K, Kurz MJ, Lau YS. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. *BMC Neurosci* 2009;10:6
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, et al. The parkinsonian toxin MPTP: a technical review of its utility and safety. *J Neurochem* 2001;76(5):1265-1274
- Przedborski S, Vila M. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003;991:189-98
- Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11 Suppl 1:3-7
- Rakic P. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 2002;1;22(3):614-618
- Ramón y Cajal S. *Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del sistema nervioso*. Tomo I: Degeneración y Regeneración de los nervios. Tomo II: Degeneración y Regeneración de los centros nerviosos. Imprenta de hijos de Nicolás Moya, Madrid 1913-1914
- Raff MC, Miller RH, Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 1983;303:390-396
- Ricaurte GA, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW. Older dopaminergic neurons do not recover from the effects of MPTP. *Neuropharmacology* 1987;26:97-99
- Rosin C, Colombo S, Calver AA, Bates TE, Skaper SD. Dopamine D2 and D3 receptor agonists limit oligodendrocyte injury caused by glutamate oxidative stress and oxygen/glucose deprivation. *Glia* 2005;52(4):336-343
- Rossi C, Angelucci A, Costantin L et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 2006;24(7):1850-1856
- Sale A, Berardi N, Maffei L. Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci* 2009;32:233-239

Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 2004;19;427(6976):740-744

Sanchez-Ramos JR, Hefti F, Weiner WJ. Paraquat and Parkinson's disease. *Neurology* 1987;37:728

Sanchez-Ramos JR, Michel P, Weiner WJ, Hefti F. Selective destruction of cultured dopaminergic neurons from fetal rat mesencephalon by 1-methyl-4-phenylperidinium: cytochemical and morphological evidence. *J Neurochem* 1988;50:1934-1944

Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting KW. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Gen* 2000;30(3):171-182

Sedelis M. Suszeptibilitätsunterschiede im MPTP- Mausmodell für Morbus Parkinson: Untersuchung genetischer Einflußfaktoren anhand von Stammvergleichen. Inauguraldissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 2001;S. 27-34, S. 66

Shan X, Chi L, Bishop M et al. Enhanced de novo neurogenesis and dopaminergic neurogenesis in the substantia nigra of MPTP- induced Parkinson's disease- like mice. *Stem Cells* 2006;24:1280-1287

Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol* 1997;148:577-586.

Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimaru S, Saito O, Shiono H. Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. *Brain Res* 2003;976:243-252

Siebert E. Regulation der zellulären Plastizität in der adulten Substantia nigra: Effekte von reizreicher Umgebung und physischer Aktivität. Dissertation, Charite-Universitätsmedizin Berlin 2008

Singh A, Gopinathan KP. Confocal Microscopy: A powerful technique for biological research. *Current Science* 1998;74: 841-851

Smith BA, Goldberg NR, Meshul CK. Effects of treadmill exercise on behavioral recovery and neural changes in the substantia nigra and striatum of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse. *Brain Res* 2011;1386:70-80

Snyder BJ, Olanow CW. Stem cell treatment for Parkinson's disease: an update for 2005. *Curr Opin Neurol* 2005;18(4):376-85

Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 2004;46:41-52

- Steiner B, Winter C, Hosman K, Siebert E, et al. 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. *Exp Neurol* 2006(a)199(2):291-300
- Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 2006(b)54:805-814
- Steiner B, Kupsch A, Siebert E, Hosmann K, et al. Unilateral lesion of the subthalamic nucleus transiently provokes bilateral subacute glial cell proliferation in the adult rat substantia nigra. *Neurosci Lett* 2008;430(2):103-8
- Steiner B, Witte V, Flöel A. Lebensstil und Kognition. Was wissen wir über das alternde und neurodegenerativ veränderte Gehirn? *Nervenarzt Epub* 14. August 2011
- Steiner B. Vorläuferzellbasierte Plastizität und Neurogenese im erwachsenen Gehirn als endogener Reparatursmechanismus bei Neurodegeneration. Habilitationsschrift, Charite- Universitätsmedizin Berlin 2012
- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampal-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 1996;383 (6601):624-627
- Takagi S, Hayakawa N, Kimoto H, Kato H, Araki T. Damage to oligodendrocytes in the striatum after MPTP neurotoxicity in mice. *J Neural Transm* 2007;114(12):1553-1557
- Tatton, N.A., Kish, S.J., In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* 1997;77, 1037-1048.
- Teismann P, Tieu K, Cohen O, et al. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003;18(2):121-129
- Trotter J, Karram K, Nishiyama A. NG2 cell: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev* 2010;63:72-82
- Uhl GR, Hedreen JC, Price DL. Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology* 1985;35, 1215–1218.
- Ungerstedt U. 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 1968;5: 107–110
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999;2:266-270
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 2000;1(3):191-198
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002;415: 1030-1034

Vila M, Vukasovic S, Jackson-Lewis V, Neystat M, Jakowec M, Przedborski S. Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. *J Neurochem* 2000;74(2):721-729

Vučković MG, Wood RI, Holschneider DP, et al. Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *Neurobiol Dis* 2008;32(2):319–327

Vučković MG, Li Q, Fisher B et al. Exercise elevates dopamine D2 receptor in a mouse model of Parkinson's disease: in vivo imaging with [¹⁸F]fallypride. *Mov Disord* 2010;15;25(16):2777-84

Wakabayashi K, Hayashi S, Yoshimoto M, Kudo H, Takahashi H. NACP/alpha-synuclein-positive filamentous inclusions in astrocytes and oligodendrocytes of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 2000;99(1):14-20

Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 2009;29(13):3974-3980

Winter C, Harnack D, Kupsch A. Deep brain stimulation for neurological and psychiatric diseases: animal experiments on effect and mechanisms. *Nervenarzt* 2010;.81(6):711-718

Wright N, Alison M. *The biology of epithelial cell populations*. Clarendon Press, Oxford Oxfordshire und New York 1984

Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K. Visualisation of neurogenesis in the central nervous system using nestin-promoter- GFP transgenic mice. *Neuroreport* 2000;11:1992-1996

Yamaguchi M. Analysis of neurogenesis using transgenic mice expressing GFP with nestin gene. *Chem Senses* 2005;30 (suppl 1):117–118

Zhao M, Momma S, Delfani K, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(13):7925-7930

Zhou FM, Lee CR. Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience* 2011;198:69-94

Zilles K. Neuronal plasticity as an adaptive property of the central nervous system. *Ann Anat* 1992;174(5):383-391

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Philipp Klaißle, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Zelluläre Plastizität der Substantia nigra im MPTP- Parkinsonmodell der Maus: Die Wirkung physiologischer Stimuli in Abhängigkeit von Dopamin* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

8. Lebenslauf

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

9. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Philipp Klaißle hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Klaissle P**, Lesemann A, Huehnchen P, Hermann A, Storch A, Steiner B. 2012. Physical activity and environmental enrichment regulate the generation of neural precursors in the adult mouse substantia nigra in a dopamine-dependent manner.

BMC Neurosci 13:132

Beitrag im Einzelnen: ca. 70% (Tierexperimente, histologische Aufarbeitung, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz, Lichtmikroskopie, konfokale Mikroskopie, Mitarbeit bei *in vitro* Analysen, statistische Auswertung, Bildbearbeitung, Erstellen der Grafiken, Mitarbeit am Manuskript).

Publikation 2: Hühnchen P, Prozorovski T, **Klaissle P**, Lesemann A, Ingwersen J, Wolf SA, Kupsch A, Aktas O, Steiner B. 2011. Modulation of adult hippocampal neurogenesis during myelin-directed autoimmune neuroinflammation. *Glia* 59(1):132-42

Beitrag im Einzelnen: Beitrag im Einzelnen: ca. 10% (Mikroskopie, Mitarbeit am Manuskript).

Publikation 3: Lesemann A, Reinel C, Hühnchen P, Pilhatsch M, Hellweg R, **Klaissle P**, Winter C, Steiner B. 2012. MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Res* 1457:51-69

Beitrag im Einzelnen: ca. 10% (Tierexperimente, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz, Mikroskopie, Mitarbeit am Manuskript).

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

10. Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. Barbara Steiner, meiner Betreuerin und Leiterin der Arbeitsgruppe „Neurale Regeneration und Plastizität“, für die Überlassung dieses Themas, die großartige Unterstützung, die Hilfsbereitschaft, die stets konstruktive Kritik und den Optimismus bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Alexander Storch und Dr. rer. med Andreas Hermann der Arbeitsgruppe „Neurodegeneration und Neuroregeneration“ am Klinikum Carl Gustav Carus der TU- Dresden für die sehr gute Kooperation, die Durchführung der zellkulturellen Untersuchung und für Anregungen und Denkanstöße.

Frau Renate Winter und Frau Jennifer Altschüler danke ich herzlich für die technische Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen- und Immunfluoreszenzfärbungen.

Ich möchte mich zudem bei allen weiteren MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe „neurale Regeneration und Plastizität“ für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft, den wissenschaftlichen Austausch und den freundlichen Umgang miteinander bedanken.

Nicht zuletzt danke ich herzlich meinen Eltern, die mir Studium und Promotion ermöglichten.